

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. Dezember 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/94910 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06415

(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. Juni 2001 (06.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 27 801.9 7. Juni 2000 (07.06.2000) DE  
100 44 132.7 6. September 2000 (06.09.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEINZLE, Elmar  
[DE/DE]; Senator-Richard-Becker-Strasse 48, 66123  
Saarbrücken (DE). WITTMANN, Christoph [DE/DE];  
Am Kalkofen 13, 66127 Saarbrücken (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-  
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KG, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
caraisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF COMPLEX MIXTURES OF CHEMI-  
CAL COMPOUNDS, USING MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN ANALYSE KOMPLEXER GEMISCHTE  
CHEMISCHER VERBINDUNGEN MIT MALDI-TOF-MASSENSPEKTROMETRIE

(57) Abstract: The invention relates to a method for the qualitative and quantitative analysis of complex mixtures of chemical com-  
pounds; using MALDI-TOF mass spectrometry, preferably in the presence of an internal standard on a special supporting material.  
The inventive method can be used in an advantageous manner to carry out biochemical flow analyses.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse komplexer  
Gemische chemischer Verbindungen mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie bevorzugt in Gegenwart eines internen Stan-  
dards auf einem speziellen Trägermaterial. Mit dem erfindungsgemässen Verfahren können vorteilhaft Bioflux-Analysen durchge-  
führt werden.

WO 01/94910 A2

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse komplexer Gemische chemischer Verbindungen mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie

5

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse komplexer Gemische chemischer Verbindungen mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie bevorzugt in Gegenwart eines internen Standards auf einem speziellen Trägermaterial.

Für die Optimierung fermentativer Prozesse ist eine genaue Kenntnis der biochemischen Flüsse der verschiedenen chemischen Substanzen bzw. Verbindungen innerhalb der Organismen von Vorteil. Diese sogenannten Bioflux-Studien erfordern die Analyse eines komplexen Gemisches chemischer Verbindungen innerhalb und außerhalb der Zellen. Üblicherweise werden für diese Bioflux-Studien, das heißt die Ermittlung der Substanzflüsse innerhalb und außerhalb der Organismen, verschiedenste Trennmethoden wie die Dünnschichtchromatographie (= DC), die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (= HPLC), die Gaschromatographie (= GC), Enzymassays; NMR und andere Analysenmethoden verwendet. Diese Verfahren sind zeitaufwendig und ermöglichen nur einen geringen Probendurchsatz.

Auch in der kombinatorischen Chemie sind komplexe Gemische chemischer Verbindungen bzw. Substanzen zu analysieren. Diese Gemische entstehen beispielsweise bei der sogenannten klassischen split and combine-Methode (= Synthese von Mischungen in einem Reaktionsgefäß) durchführt. Die oben genannten Analysenmethoden werden auch in diesem Fall zur Analyse verwendet.

Auch beim Screening nach neuen enzymatischen Reaktionen werden die oben genannten Analysenmethoden verwendet. Dieses Screening hängt im großen Maß vom Zufall ab. In einem solchen Screening müssen sehr viele Organismen nach der gewünschten enzymatischen Aktivität durchgemustert werden, bis die gewünschte Enzymaktivität gefunden wird. Auch hier sind in der Regel komplexe Gemische zu analysieren.

Für die Bioflux-Studien, die kombinatorischen Synthesen ebenso wie für das Screening nach Enzymaktivitäten sind daher schnelle, einfache, hochempfindliche und hochspezifische Analysenverfahren erforderlich. Dabei ist die rasche und einfache Identifizierung der in der chemischen oder enzymatischen Reaktion oder im

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

2

fermentativen Prozeß entstehenden Verbindungen und/oder gegebenenfalls die Abnahme des eingesetzten Edukts und/oder bei einem fermentativen Prozeß die Abnahme der eingesetzten Kohlenstoffquelle wie Glucose oder Saccharose oder der eingesetzten Stickstoffquelle wie Proteinhydrolysate und die Bildung neuer chemischer Verbindungen aus diesen wichtig. In der Regel werden wie oben erwähnt zur Analyse der Produkte Trennverfahren wie die Dünnschichtchromatographie (= DC), die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (= HPLC) oder die Gaschromatographie (= GC) verwendet. Auch Verfahren wie NMR, die nach einer Aufarbeitung über zum Beispiel Salzfällung und/oder anschließender Chromatographie anwendbar sind, können zur Analyse verwendet werden. Diese Verfahren sind zeitaufwendig und lassen nur einen beschränkten Probendurchsatz zu, so daß derartige Analysenverfahren für das sogenannte High-Throughput-Screening (= HTS), bei dem zunächst nach der gewünschten Reaktion gescreent wird, keine Anwendung finden. Von Vorteil bei diesen Methoden ist, daß Informationen sowohl über die Produkte der Reaktion als auch gegebenenfalls über die Abnahme des Edukts liefern.

Um einen höheren Probendurchsatz im HTS zu ermöglichen, werden vielfach indirekte, leicht meßbare Verfahren wie Farbreaktionen im sichtbaren Bereich, Trübungsmessungen, Fluoreszenz, Leitfähigkeitsmessungen etc. verwendet. Diese sind zwar im Prinzip sehr empfindlich, aber auch störanfällig. Von Nachteil hierbei ist vor allem, daß bei diesem Vorgehen viele falsch positive Proben analysiert werden und da es sich um indirekte Nachweisverfahren handelt, keine Informationen über Produkt und/oder Edukt vorliegen. Darüberhinaus liefern diese Verfahren in der Regel kaum Informationen über die Flußverteilungen. Um diese falsch Positiven beim weiteren Vorgehen ausschließen zu können, werden in der Regel weitere Analysenverfahren nach dem ersten Screening wie beispielsweise DC, HPLC oder GC verwendet. Dies ist wiederum sehr zeitaufwendig.

Generell kann gesagt werden, daß die Verbesserung der Empfindlichkeit und der Aussagekraft der Detektionsverfahren bezüglich der Reaktionsprodukte zu einer Verlangsamung in der Geschwindigkeit eines Tests führt.

Für sogenannte Bioflux-Studien, in denen die metabolischen Stoffflüsse ermittelt werden, finden derartige Methoden insbesondere NMR trotz ihres hohen Zeitaufwandes aufgrund ihrer Aussagekraft über die verschiedensten chemischen Verbindungen, die durch den Metabolismus der Organismen entstehen, Anwendung. Zur Vereinfachung dieser Studien und damit der Ermittlung der metabolischen Stoffflüsse wäre jedoch ein schnelles, hochempfindliches und

hochspezifisches Analysenverfahren wünschenswert.

MALDI-TOF-MS (= Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation mit time-of-flight Massenspektrometrie) stellt ein rasches und  
5 einfaches Verfahren dar, das breit für die Analyse von großen, nichtflüchtigen Biomolekülen wie im besonderen Peptiden, Proteinen, Oligonukleotiden und Oligosacchariden oder sonstigen Polymeren Anwendung findet. Auch hochmolekulare Materialien wie Kohleteer, Huminsäure, Fulvinsäure oder Kerogene wurden mit MALDI  
10 analysiert (Zenobie and Knochenmus, Mass Spec. Rev., 1998, 17, 337-366).

Ein Problem bei der MALDI-MS ist die Quantifizierung der Meßergebnisse, dies liegt daran, daß die Signalintensität in  
15 hohem Maße von der Homogenität der aufgegebenen Probe und der Bestrahlungsdichte des Lasers abhängt (Ens et al., Rapid Commun. Mass Spectrom, 5, 1991: 117-123), wobei die Intensität in erster Näherung expotentiell mit steigender Laserenergie ansteigt (Ens et al., Rapid Commun. Mass Spectrom, 5, 1991: 117-123). Wird die  
20 Signalintensität zu hoch, so kann es unter Umständen zu einer Sättigung des Signals am Detektor kommen, was eine Quantifizierung ebenfalls ausschließt. Neben diesen physikalisch-technisch-bedingten Problemen gibt es weitere Gründe, welche eine quantitative Auswertung von MALDI-Messungen erschweren. So können  
25 beispielsweise Fragmente der gesuchten Ionen oder Moleküladdukte auftreten. Das größte Problem bei der quantitativen MALDI-MS stellt jedoch die Inhomogenität der Proben dar. Die Qualität eines MALDI-Spektrums ist in starkem Maße von der Morphologie der untersuchten Probe abhängig (Garden & Sweedler, Anal. Chem. 72,  
30 2000: 30-36). Dabei können signifikante Unterschiede in Bezug auf das Auftreten von Signalen, die Intensität, die Auflösung und die Massengenauigkeit beobachtet werden, sobald man eine MALDI-Probe an verschiedenen Stellen untersucht (Cohen & Chait, Anal. Chem., 68, 1996: 31-37; Strupat et al., Int. J. Mass Spectrom. Ion  
35 Processes, 111, 1991: 89-102; Amado et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 1997: 1347-1352). Diese Inhomogenitäten beruhen auf einer ungleichen Verteilung von Matrix und Analyt auf dem Proben target, was durch das ungleiche Kristallisationsverhalten dieser beiden Komponenten verursacht wird. Um diese Inhomogeni-  
40 täten zu beseitigen oder zu minimieren - was gleichbedeutend mit der Bildung einer mikrokristallinen, homogenen Proben topologie ist - wurde bereits eine Reihe von Vorschlägen erarbeitet. Diese beinhalten beispielsweise die Verwendung von Comatrices (Gusev et al., Anal. Chem., 67, 1995: 1034-1041), Multi-Layer-  
45 Präparationen, die Verwendung von Lösungsmittelgemischen und Elektrospray-Präparationen (Hensel et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 1997: 1785-1793) (eine Zusammenstellung dieser

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

4

Versuche findet sich in der Referenz von Garden & Sweedler, Anal. Chem. 72, 2000: 30-36). All diese Ansätze haben jedoch Limitierungen und sind deshalb nicht breit anwendbar. Die Quantifizierung ist deshalb nach wie vor ein Problem.

5

Für die MALDI (= Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation) werden die Proben in der Regel in dünner Schicht auf eine Metalloberfläche aufgebracht und dann mit einem gepulsten Laser bestrahlt. Über eine Fokussierung der emittierten Ionen kann die Auflösung der Massenspektren im unteren Massenbereich bis etwa 5000 D erhöht werden.

Duncan et al. (Rapid Communications in Mass Spectrometry, Vol. 7, 1993: 1090-1094) beschreibt die Analyse der niedermolekularen polaren Verbindungen 3,4-Dihydroxyphenylalanin, Acetylcholin und des Peptids Ac-Ser-Ile-Arg-His-Tyr-NH<sub>2</sub> mit Hilfe von MALDI in Gegenwart der entsprechenden über <sup>13</sup>C bzw. <sup>2</sup>H markierten Verbindungen bzw. über ein ähnliches Peptid als interner Standard.

20 Von Goheen et al. (J. Mass Spec., Vol. 32, 1997: 820-828) wird die Verwendung von MALDI-TOF-MS zur Analyse der folgenden niedermolekularen Verbindungen beschrieben:

Zitronensäure, Propionsäure, Buttersäure, Oxalsäure und Stearinsäure, Ethylendiamintetraessigsäure (= EDTA), N-(2-hydroxyethyl)-ethylendiamintriessigsäure (= HEDTA), Ethylendiamine-N,N'-diessigsäure (= EDDA) und Nitrilotriessigsäure (= NTA) sowie Sulfat-, Nitrat-, Nitrit- und Phosphat-Salze. Als Matrix in allen Experimenten wird 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet.

30 Von Nachteil bei beiden Methoden ist, daß sie nur für die Messung von Reinsubstanzen geeignet sind. Diese Problematik wird in der Diskussion von Duncan et al. angesprochen, dort wird zur Überwindung dieser Schwierigkeit die Reinigung der Meßproben vorgeschlagen.

35

Insgesamt ist die MALDI-TOF-MS jedoch eine interessante einfache und rasche Methode, die spezifische Informationen über die analysierten Verbindungen liefert, so daß die Verwendung der MALDI-TOF-MS zur Messung von chemischen oder enzymatischen Reaktionen oder von fermentativen Prozessen mit niedermolekularen Substanzen wünschenswert wäre. Speziell wäre ihre Verwendung im High-Throughput-Screening und in der Bioflux-Analyse wünschenswert.

Es bestand daher die Aufgabe ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse komplexer Gemische chemischer Verbindungen unter Verwendung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu entwickeln.

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 5

Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse komplexer Gemische chemischer Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert werden, gelöst. Diese 5 komplexen Gemische können in einer chemischen oder enzymatischen Reaktion oder in einem fermentativen Prozeß entstehen.

Komplexe Gemische chemischer Verbindungen sind Gemische, die mindestens zwei, bevorzugt mindestens drei, besonders bevorzugt 10 mindestens vier, ganz besonders bevorzugt mindestens fünf chemische Verbindungen enthalten, die in der Analyse mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert und gegebenenfalls quantifiziert werden sollen. Ebenfalls besonders bevorzugte komplexe Gemische chemischer Verbindungen sind Gemische, die 15 vor, während oder nach einem fermentativen Prozess innerhalb und außerhalb der Organismen entstehen. Im komplexen Gemisch chemischer Verbindungen können polymere Verbindungen (= Substanzen) wie Proteine wie Enzyme, Rezeptoren etc., Polysaccharide wie Glykoproteine, Glykolipide etc., Polynukleotide wie DNA oder 20 RNA und/oder nichtpolymere Verbindungen vorhanden sein. Diese chemischen Verbindungen können mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens allein oder in Kombination mit den nichtpolymeren Verbindungen analysiert werden. Bevorzugt werden nur die nichtpolymeren Verbindungen besonders bevorzugt die nichtpolymeren, 25 organischen Verbindungen analysiert.

Nichtpolymere, organische Verbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren sind Verbindungen, die vor allem keine Peptide, Proteine, Oligo- oder Polynukleotide oder Oligo- oder Polysaccharide oder 30 künstliche oder natürliche Polymere sind. Diese nichtpolymeren organischen Verbindungen (= niedermolekulare Verbindungen) haben eine Molmasse von kleiner 4000 D (= Dalton), vorteilhaft von kleiner 3000 D, bevorzugt kleiner 1000 D, besonders bevorzugt von kleiner 800 D, ganz besonders bevorzugt kleiner 600 D. Als der- 35 artige niedermolekulare organische Verbindungen seien beispielsweise Zucker wie Monosaccharide wie Glucose oder Fructose, Disaccharide wie Saccharose oder Maltose, Tri- oder Tetrasaccharide, Aminosäuren wie natürliche Aminosäuren wie Lysin, Threonin, Alanin, Phenylalanin, Isoleucin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure um nur einige zu nennen oder künstliche 40 Aminosäuren, Di- oder Tripeptide niedere Carbonsäuren wie Monocarbonsäuren wie Essigsäure, Propionsäure oder Dicarbonsäuren wie Oxaloesigsäure oder Tricarbonsäuren wie Citronensäure, Terpene, Steroide, Carotinoide, Vitamine, Antibiotika wie Nukleosidantibiotika, Polyketide,  $\beta$ -Lactame wie Penicilline oder Cephalosporine oder Fettsäuren beispielhaft genannt. 45

6

Unter chemischen Reaktionen im Sinne der Erfindung sind alle chemischen Reaktionen der organischen und anorganischen Chemie bevorzugt der organischen Chemie zu verstehen.

- 5 Derartige chemische Reaktionen bei denen komplexe Gemische entstehen kommen beispielsweise in der kombinatorischen Chemie vor. Diese Gemische entstehen beispielsweise in der kombinatorischen Chemie bei der sogenannten klassischen split and combine-Methode (= Synthese von Mischungen in einem Reaktionsgefäß). Derartige Reaktionslösungen bzw. Gemische lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren analysieren.

- Unter enzymatischen Reaktionen sind Enzym-katalysierten Umsetzungen mit ganzen Zellen zu verstehen, die pflanzlichen, tierischen, bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs sein können, auch Hefezellen sind geeignet. Die enzymatische Umsetzung kann mit ruhenden, wachsenden, permeabilisierten oder immobilisierten Zellen bzw. Mikroorganismen erfolgen. Auch Enzyme sind für die Enzym-katalysierte Umsetzung geeignet. Diese Enzyme können noch in den permeabilisierten Zellen oder Mikroorganismen enthalten sein oder aber in sogenannten Rohextrakten vorhanden sein. Für eine raschere und in der Regel auch Nebenprodukt freiere Umsetzung werden angereinigte oder gereinigte Enzyme verwendet, die in der Umsetzung als freie oder immobilisierte Enzyme verwendet werden können. Bevorzugt wird die Reaktion mit freien, angereinigten, gereinigten oder immobilisierten Enzymen durchgeführt.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Enzyme der Enzymklassen 1 bis 6 (International Union of Biochemistry and Molecular Biology = IUB) verwendet, bevorzugt werden die Enzymklassen 1 bis 4, besonders bevorzugt die Enzymklasse 3 wie die Klassen 3.1 (Reaktion mit Esterbindungen), 3.2 (Glycosidasen), 3.3 (Reaktion mit Etherbindungen), 3.7 (Reaktion mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen), 3.11 (Reaktion mit Kohlenstoff-Phosphorbindungen), ganz besonders bevorzugt sind Enzyme wie Lipasen, Esterasen oder Phosphatasen wie Phytasen. Weitere vorteilhafte Enzyme sind in der Enzymklasse 6 zu finden.

- 40 Fermentative Prozesse im Sinne der Erfindung sind Prozesse, in denen Mikroorganismen wie pflanzliche oder tierische Zellen, Bakterien, Pilze, Hefen, Algen oder Ciliaten bevorzugt Bakterien, Pilze oder Hefen in Gegenwart einer Kohlenstoffquelle, einer Stickstoffquelle, einer Phosphatquelle, Salzen wie Alkali- und Erdalkalisalzen und ggf. Vitaminen und Spurenelementen in dem Fachmann bekannter Weise bei Temperaturen je nach Organismus von 10°C bis 110°C, unter pH-Kontrolle oder ohne pH-Kontrolle, mit

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

7

oder ohne Begasung angezogen werden. Bei diesen fermentativen Prozessen fallen eine Reihe von chemischen Verbindungen durch den Metabolismus der Organismen (sowohl den anabolen als auch katabolen Metabolismus) an, die innerhalb oder außerhalb der Zelle vorliegen. Zur Optimierung derartiger fermentativer Prozesse ist eine genaue Kenntnis der biochemischen Flüsse der verschiedenen chemischen Substanzen bzw. Verbindungen innerhalb und außerhalb der Organismen von Vorteil. Das heißt eine genaue Kenntnis des Metabolismus der Organismen ist erforderlich. Diese Kenntnis wird über sogenannten Bioflux-Analysen bzw. Studien gewonnen. Diese Bioflux-Studien erfordern die Analyse eines komplexen Gemisches chemischer Verbindungen innerhalb und außerhalb der Zellen. Dies ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auf schnelle, einfache und spezifische Weise möglich. Mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie lassen sich einfach und hoch spezifisch chemische Verbindungen wie Aminosäuren wie Lysin oder Alanin oder Zucker und Zuckerabbauprodukte wie Glucose oder Saccharose oder Lipide qualitativ und quantitativ nachweisen. Durch diese Analysen lassen sich die Verbindungen und damit die in der Zelle vorhandenen internen sogenannten pools der verschiedenen Verbindungen genau bestimmen. Vorteilhaft können über gemessene Intensitätsverteilungen der verschiedenen Isotopomere bzw. von Gruppen von Isotopomeren Flussverteilungen und Reaktionen bestimmt bzw. ermittelt werden. So können mögliche Engpässe im Metabolismus, das heißt Enzyme, die beispielsweise eine zu geringe Aktivität im Stoffwechsel aufweisen, erkannt werden. Diese Engpässe können dann über gentechnische Methoden wie Überexpression der zugehörigen Gene optimiert werden.

Gemische chemischer Verbindungen im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens sind auch beispielsweise in Lebensmittelproben, Pharmakaproben oder Umweltproben vorhanden, in denen bestimmte Inhaltsstoffe das heißt bestimmte chemische Verbindungen nachgewiesen werden sollen beispielsweise die Belastung von Lebensmitteln mit Pestiziden oder die Belastung von Böden mit Umweltgiften. Auch Gemische chemischer Verbindungen aus Pflanzen wie Pflanzenextrakte oder aus dem Tier oder Mensch beispielsweise Blutproben oder Organproben lassen sich im erfindungsgemäßen Verfahren analysieren. So läßt sich beispielsweise Glucose im Blut messen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher für die Spurenanalytik, für die Quantifizierung von Substanzen sowie für die Diagnostik geeignet. Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren für die Bioflux-Analyse von Fermentationsproben, Umweltproben und Lebensmittelproben.

Der Meßfehler bei der Bestimmung der chemischen Verbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren liegt unter 10 %, bevorzugt unter



7,5 %, besonders bevorzugt unter 5 %.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können neben der Analyse von chemischen Verbindungen auch vorteilhaft Enzymreaktionen  
5 verfolgt werden, das heißt es können Enzymkinetiken aufgestellt werden. Weiter kann der  $K_m$ -Wert, der  $V_{max}$ -Wert, die Selektivität des Enzyms, die Ausbeute der Reaktion bestimmt werden sowie die Auswirkung von Inhibitoren auf die Enzymreaktion in vivo und in vitro verfolgt werden. Auch können mögliche Reaktionsparameter  
10 wie die Temperatur oder der pH auf die Enzym-katalysierte Reaktion untersucht werden.

Eine Reinigung der Reaktions- bzw. Fermentationslösung ist für das erfindungsgemäße Verfahren vor der Analyse mit der MALDI-TOF-  
15 Massenspektrometrie nicht erforderlich. Die Reaktion kann direkt gemessen werden. Dies gilt insbesondere für komplexe Probengemische auf Fermentationsbrühen im Rahmen von Bioflux-Analysen. Auch müssen für die Reaktion keine Reinsubstanzen verwendet werden obwohl dies natürlich möglich ist.

20 Vorteilhaft können chemische Verbindungen, die im MALDI-TOF-MS nur schlecht oder gar nicht nachweisbar sind vor der Analyse derivatisiert werden (siehe Beispiele) und so schließlich analysiert werden. Die Derivatisierung kann vor oder nach der  
25 chemischen oder enzymatischen Reaktion oder des fermentativen Prozesse erfolgen. Eine Derivatisierung ist besonders vorteilhaft in Fällen, in denen in hydrophobe bzw. flüchtige Verbindungen beispielsweise wie Ester, Amide, Lactone, Aldehyde, Ketone, Alkohole etc. hydrophile Gruppen eingeführt werden, die vorteil-  
30 haft noch eine ionisierbare Funktionalität tragen. Beispiele für derartige Derivatisierungen sind Umsetzungen von Aldehyden oder Ketonen zu Oximen, Hydrazonen oder deren Derivate oder Alkoholen zu Estern beispielsweise mit symmetrischen oder gemischten Anhydriden. Dies erweitert das Nachweisspektrum des Verfahrens  
35 signifikant. Die Derivatisierung nach Ablauf der chemischen oder enzymatischen Reaktion oder des fermentativen Prozesses ermöglicht die direkte Messung des Originalsubstrats der Reaktion bzw. des Prozesses. Durch die Verwendung der MALDI-TOF-MS können dadurch auch Substanzen analysiert werden, die keinen Chromophor  
40 enthalten. Dies ist gegenüber anderen Verfahren ein erheblicher Vorteil, da für beispielsweise übliche Detektionsverfahren beispielsweise über eine visuelle Erkennung in der Regel artifizielle Substrate, die beispielsweise einen Chromophor enthalten, verwendet werden müssen. Diese führen bei einer  
45 Optimierung auf diese Reaktion möglicherweise nicht zu einer Verbesserung der gewünschten natürlichen enzymatischen Umsetzung, da die Optimierung dieser artifiziellen Reaktion nicht die natür-

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

9

lichen Verhältnisse widerspiegelt.

Vorteilhaft wird im erfindungsgemäßen Verfahren zur Analyse der chemischen oder enzymatischen Reaktion oder des fermentativen  
5 Prozesses ein interner Standard zugesetzt. Dieser interne Standard ermöglicht vorteilhaft die Quantifizierung der niedermolekularen Verbindungen in der Reaktionslösung. Dieser Standard kann der chemischen oder enzymatischen Reaktion oder dem fermentativen Prozess vor Beginn, während oder nach Abschluß der  
10 chemischen oder enzymatischen Reaktion oder des fermentativen Prozesse zugesetzt werden. Vorteilhaft wird der interne Standard dem fermentativen Prozess vor Beginn zugesetzt beispielsweise in Form von markierten Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen. Diese Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen dienen dabei als Substrat,  
15 das heißt der interne Standard dient in diesem Fall als Substrat im Metabolismus der Organismen. In diesem Fall handelt es sich bei dem internen Standard um eine sogenannte "Tracer-Substanz" mit deren Hilfe ein Markierungsmuster der entstehenden Verbindungen im Organismus durch anabole und/oder katabole Reaktionen im Metabolismus erstellt werden kann. Mit Hilfe dieses Markierungsmuster kann der spezielle Metabolismus eines Organismus beispielsweise eines Mikroorganismus wie einem Bakterium oder einem Pilz oder einer Pflanze oder einem Tier oder Mensch aufgeklärt werden. Die Markierung des internen Standards überträgt  
25 sich in diesem Fall auf die entstehenden Metabolite des Stoffwechsels. Es können so die metabolischen Flüsse im Organismus studiert und identifiziert werden. Es lassen sich so Zwischenprodukte im Stoffwechsel nachweisen. Dies gilt auch für Zwischenprodukte chemischer oder enzymatischer Reaktionen. Im Vordergrund  
30 bei diesen Bioflux-Analysen steht die Quantifizierung der Isotopomerenverteilung der verschiedenen markierten Zwischenprodukte des Metabolismus. Die Zwischenprodukte können aber auch neben dem qualitativen Nachweis noch quantifiziert werden. Dazu können weitere anders markierte internen Standards nach dem Ende der Reaktion oder der Fermentation zugesetzt werden. Die Zwischenprodukte sind letztlich auch als Produkte des zu Beginn der Reaktion eingesetzten Edukts zu verstehen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können demnach auch Enzymreaktionen verfolgt bzw. analysiert werden, die aufeinanderfolgende Reaktion katalysieren. Diese können  
40 durch ein Enzym oder durch mehrere Enzyme katalysiert werden. Auch Nebenprodukte können analysiert werden.

Als internen Standard werden vorteilhaft markierte Substanzen verwendet, die vorteilhaft im Stoffwechsel in einem Organismus  
45 umgesetzt werden oder die in einer chemischen oder enzymatischen Reaktion umgesetzt werden. Es sind aber auch prinzipiell den Edukten und/oder Produkten ähnliche chemische Verbindungen als

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

10

interner Standard geeignet. Derartige ähnliche chemische Verbindungen sind beispielsweise sogenannten Verbindungen einer homologen Reihe, deren Mitglieder sich nur durch beispielsweise eine zusätzliche Methylengruppe unterscheiden. Als interner  
5 Standard werden bevorzugt durch mindestens ein Isotop ausgewählt aus der Gruppe  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{30}\text{Si}$ ,  $^{74}\text{Se}$  oder deren Mischungen markiertes Edukt, Produkt, wobei Edukt und/oder Produkt eine organische Verbindung sein können, die als Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle oder sonst  
10 irgendwie im Organismus Verwendung finden kann, oder eine weitere markierte chemische Verbindung verwendet. Vorteilhaft wird die chemische Verbindung durch mindestens ein Isotop ausgewählt aus der  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{30}\text{Si}$ ,  $^{74}\text{Se}$  oder deren Mischungen markiert. Bevorzugt wird aus Kosten-  
15 gründen und aus Gründen der Zugänglichkeit  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  oder  $^{13}\text{C}$  als Isotop verwendet. Beispiele für derartig markierte Substanzen sind L- $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ -Lysin, L-1- $^{13}\text{C}$ -Alanin und 1- $^{13}\text{C}$ -Glucose. Diese internen Standard brauchen für die Analyse nicht komplett, das heißt vollmarkiert zu sein. Eine Teilmarkierung ist völlig ausreichend. Ein  
20 Abstand der Markierung von größer/gleich 3 Dalton bis kleiner/gleich 10 Dalton ist vorteilhafterweise ausreichend. Eine Messung ist aber auch unter 3 Dalton oder über 10 Dalton prinzipiell möglich, wobei aber bei kleinen Abständen eventuell Überlagerungen mit den Isotopen des Analyten oder bei größeren  
25 Abständen eventuell Isotopeneffekte auftreten können. Dies erschwert die Messungen macht sie aber nicht unmöglich. Vorteilhaft wird auch im Falle eines markierten internen Standards eine Substanz gewählt, die eine möglichst hohe Homologie, das heißt strukturelle Ähnlichkeit, zu der zu messenden chemischen Ver-  
30 bindung hat. Je höher die strukturelle Ähnlichkeit ist, desto besser sind die Meßergebnisse und desto genauer kann eine Quantifizierung der Verbindung erfolgen.

Für das erfindungsgemäße Verfahren und besonders für die Quanti-  
35 fizierung der in der Reaktion vorhandenen chemischen Verbindungen wie Edukte, Produkte, Zwischenprodukte oder Nebenprodukte ist es vorteilhaft den internen Standard in einem günstigen Verhältnis zu der zu messenden Verbindung wie Edukt, Produkt, Zwischenprodukt oder Nebenprodukt einzusetzen. Verhältnisse von Analyt  
40 (= zu bestimmende Verbindung) zu internem Standard größer 1:15 führen zu keiner Verbesserung der Meßergebnisse, sind jedoch prinzipiell möglich. Vorteilhaft wird ein Verhältnis von Analyt zu internem Standard in einem Bereich von 0,1 bis 15 eingestellt, bevorzugt in einem Bereich von 0,5 bis 10, besonders bevorzugt  
45 in einem Bereich von 1 bis 5, ganz besonders bevorzugt einem Verhältnis von 1:1.

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 11

Wenn bei der Bioflux-Analyse Flußverteilungen und Reversibilitäten von Reaktionen bestimmt werden, so wird der interne Standard vorteilhaft in solchen Mengen zugegeben, daß die resultierenden Intensitätsverteilungen der Analyte vorteilhaft in einem Bereich von 0,1 bis 10, bevorzugt in einem Bereich von 0,2 bis 5, besonders bevorzugt in einem Bereich von 0,5 bis 2, ganz besonders bevorzugt in einem Verhältnis von 1:1 liegen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Messung von nicht-polymeren Verbindungen in einer vorteilhaften Konzentration von 1 µM bis 500 mM, bevorzugt von 10 µM bis 100 mM.

Vorteilhaft werden die Analysenproben auf einen möglichst kleinen Raum bzw. auf einen möglichst kleinen Durchmesser konzentriert, um eine weitere Verbesserung der Meßpunktsauflösung bzw. Meßgenauigkeit zu erreichen.

Die Reaktionsproben im erfindungsgemäßen Verfahren können manuell oder vorteilhaft automatisch mit üblichen Laborrobotern vorbereitet werden. Auch die Analyse mit MALDI-TOF-MS kann manuell oder vorteilhaft automatisch durchgeführt werden. Durch die Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die MALDI-Massenspektrometrie vorteilhaft zum schnellen Screening Enzymkatalysierter Reaktionen im sogenannten High-Throughput-Screening verwendet werden. Dabei zeichnet sich die MALDI-TOF-MS durch eine hohe Empfindlichkeit bei geringstem Probenverbrauch aus. So kann beispielsweise ein rasches Screening nach metabolischen Aktivitäten in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Mit der Methode können als rasch neue Enzymaktivitäten sowie neue Mutanten bekannter Enzyme nach einer Mutagenese beispielsweise über nach einer klassischen Mutagenese mit chemischen Agentien wie NTG, Strahlung wie UV-Strahlung oder Röntgenstrahlung oder nach einer sogenannten site-direkted mutagenesis, PCR-Mutagenese oder dem sogenannten gene shuffling gefunden werden. Dies zeigt sich in einer Veränderung bei der Bioflux-Analyse gegenüber dem entsprechenden Ausgangsorganismus.

Vorteilhaft werden für das erfindungsgemäße Verfahren Trägermaterialien mit einem Rauigkeitwert bzw. einer Rauigkeitszahl von  $R_z$  größer 1, bevorzugt größer 2, besonders bevorzugt größer 3, ganz besonders bevorzugt größer 4 verwendet. Dabei bedeutet  $R_z$  die gemittelte Rauhtiefe (µm) als arithmetisches Mittel aus den Einzelrauhtiefen fünf aneinandergrenzenden Einzelmeßstrecken. Die Rauhtiefe wird nach DIN 4768 ermittelt. Diese Trägermaterialien sind polierte, beschichtete oder bedampfte Trägermaterialien oder polierte und beschichtete oder polierte und bedampfte Trägermaterialien. Die Träger bestehen aus einem Material ausgewählt aus

12

der Gruppe Glas, Keramik, Quarz, Metall, Stein, Kunststoff, Gummi, Silicium, Germanium oder Porzellan. Bevorzugt besteht das Material aus Metall oder Glas.

- 5 Zur Ermittlung weiterer Analysendaten kann im erfindungsgemäßen Verfahren die Analyse zusätzlich mit Hilfe des metastabilen Zerfalls nach der Ionisierung oder des stoß-induziertem Zerfalls erfolgen. Dadurch können weitere Massendaten gewonnen werden, die die Identifizierung der vorhandenen Edukte, Produkte, Neben-
- 10 produkte oder Zwischenprodukte erleichtern bzw. ermöglichen und vorteilhaft auch die Bestimmung der Isotopomerenverteilung erweitern.

- Vorteilhaft wird im erfindungsgemäßen Verfahren die Dynamik
- 15 des Markierungsmusters und die Konzentration der chemischen Verbindungen speziell in den enzymatischen Reaktion bzw. in den fermentativen Prozessen gemessen. Dadurch können Enzymkinetiken oder zellinterne oder zellexterne Substanz-Pools oder sonstige kinetische Parameter analysiert werden. Es können so  $K_m$  und  $V_{max}$
- 20 eines Enzyms bestimmt werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

25

- Die folgenden Beispiele zeigen die Quantifizierung von Metaboliten des Stoffwechsels (= chemische Verbindungen) während der Fermentation des Lysin-produzierenden Mikroorganismus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253. Die Lysin-Produktion mit Mikro-
- 30 organismen ist einer der großen biotechnologischen Fermentationsprozesse (Jetten und Sinskey, Crit. Rev. Biotechnol., 15, 1995: 73-103).

Für die Versuche wurden folgenden Chemikalien verwendet:

- 35 95 bis 99 % L- $\alpha^{15}N$ -Lysin, 99 % L-1- $^{13}C$ -Alanin und 99 % 1- $^{13}C$ -Glucose von Euroisotop (Gif-sur-Yvette, Frankreich), Zuckermelasse von Südzucker AG (Mannheim/Ochsenfurt, Deutschland) mit einem Trockengewicht von 84 % und einer Polarität von 51,4 und einem pH von 7,4. Alle anderen Chemikalien stammen von Sigma-
- 40 Aldrich (Deisenhofen, Deutschland).

- Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 wurde auf PMB-Medium (Vallino und Stephanopolus, Biotechnol. Bioeng., 41, 1993: 633-646) entweder mit 18 g/l Glucose als Kohlenstoffquelle
- 45 (= Mineralmedium) oder mit 20 g/l Melasse (= Komplexmedium) angezogen. Mit 0,9 % NaCl gewaschene, auf LBG5-Medium (Vallino und Stephanopolus, Biotechnol. Bioeng., 41, 1993: 633-646) vorge-

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 13

zogene Zellen wurden in 0,9 % NaCl resuspendiert und als Inoculum genommen. Die Experimente mit Melasse wurden in 100 ml Schüttelkolben durchgeführt. Die Kultivierung in Mineralmedium wurden in 100 ml Bioreaktoren (Meredos, Nörten-Hardenberg, Deutschland) durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei pH 7,0 und 30°C.

Die Biomasse wurde bei einer optischen Dichte von 660 nm (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland) und als Biotrockenmasse gravimetrisch bestimmt. Der Korrelationsfaktor zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse ist  $0,29 \cdot OD_{660nm} = \text{Biotrockenmasse in der Einheit g/l}$ . Die Aminosäuren wurden in Doppelbestimmungen mit der HPLC unter Verwendung eines Derivatisierungs-Kits (ACCQ-TAG, Waters, Milford, USA), einer ACCQ-TAG-Säule (Waters, Milford, USA) mit einem Gradienten aus ACCQ-EluentA (Waters, Milford, USA) und Acetonitril/Wasser (60:40) bei einem Fluß von 0,8 ml/min, 37°C und UV-Detection bei 250 nm. Die Meßfehler bei der Lysin- und Alanin-Bestimmung betrugen jeweils 1,6 bzw. 2,5 %. Glucose wurde enzymatisch in Doppelbestimmungen bestimmt (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland). Der Meßfehler bei den Bestimmungen betrug 1,7 %.

Die MALDI-TOF-MS-Messungen wurden mit einem Bruker Reflex III (Bruker-Franzen, Bremen, Deutschland) mit einem 337 nm Stickstofflaser und einem rechtwinkligen 384-Well Scout target zur Probenaufnahme durchgeführt. Das Gerät verfügt über einen 8 Bit Digitalisierer. Als Matrix wurden verschiedenen Verbindungen verwendet. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (= DHB) wurde in Methanol (200 mg/ml) und 5-Aminoquinolin (= 5AQ) in deionisiertem Wasser (75 mg/ml) gelöst. Die folgenden Matrixes wurden in bis zur Sättigung in einem Gemisch von Acetonitril:Wasser:Trifluoressigsäure (70:30::0,1) gelöst: Sinapinsäure (= SA), Trihydroxyacetophenon (= TACP) und 4-Hydroxy-azobenzol-2-carbonsäure (= HABA). Im Falle der Matrixes SA, HABA, TACP und 5AQ wurden 0,3 µl Matrix in die Mitte eines Meßpunktes pipettiert und an der Luft getrocknet. Danach wurden auf jeden Meßpunkt 0,3 µl der zu messenden Proben pipettiert. Die besten Ergebnisse wurden mit DHB als Matrix nach folgenden Schema erzielt: Ein dünner Film der Matrixlösung wurde auf einen Metallträger durch langsame Bewegung der Pipette über benachbarte Meßpunkte aufgetragen. Durch die Oberflächenspannung wurde die Lösung automatisch von der Pipettenspitze auf den Metallträger übertragen und bildete dort einen dünnen Film, der innerhalb von Sekunden abtrocknete. Die Proben (0,3 µl) wurden anschließend in die Mitte der Meßpunkte pipettiert. Die so behandelte Metallträgerplatte wurden an der Luft über ca. 10 Minuten getrocknet und anschließend direkt in die Vakuumkammer des MALDI-Meßgeräts eingeführt. Jeder Meßpunkt wurde mit 50 Laser-

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 14

schüssen aus 5 verschiedenen Positionen analysiert. Je fünf Meßpunkte wurden pro zu messender Probe hergestellt und analysiert. In einigen Fällen lieferten die Schüsse aufgrund der heterogenen Kristallisation übersteuerte oder zu schwache Signale (< 10 Zähler pro Schuß). Aufgrund der Tatsache das die Integration der Flächeneinheiten solcher Schüsse zu Fehlern führen würden, wurden sie von der Analyse ausgeschlossen. Die direkte Verwendung des Überstands der Fermentationsbrühen führte gewöhnlich zu dicken und dichten Kristallen mit eine schwachen Signaleffizienz selbst für Matrixionen. Dieser Effekt liegt vermutlich am hohen Salzgehalt der Fermentationsbrühen, welcher die Sensitivität der MALDI-Analysen bekanntlichmaßen herabsetzt (Karas et al., Biomed. Environ. Mass Spectrom. 18, 1989: 841-843). Eine beispielsweise 1:5 Verdünnung der Proben mit beispielsweise deionisiertem Wasser vor der MALDI-Analyse verbessert die Ergebnisse drastisch.

## Beispiel 1: Detektion der Metabolite mit MALDI-TOF-MS

Lysin, Alanin, Glucos und Sucrose wurden mit positiven Reflectormodus bestimmt. Figur 1a zeigt das Spektrum einer 2,5 mM Mischung dieser 4 Verbindungen mit einer DHB-Matrix in deionisiertem Wasser. Als Kontrolle zeigt Figur 1b reines deionisiertes Wasser. Die gebildeten Ionen konnten klar den einzelnen Analyten durch Einzelanalyse der Analyten und Vergleich mit den Spektren stabiler markierter Isotopen der Analyten zugeordnet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Alanin und Lysin bilden hauptsächlich  $[M+H]^+$ -Ionen bei jeweils  $m/z$  90 und  $m/z$  147. Mit geringerer Intensität wurden Addukte der zwei Verbindungen mit Natrium- und Kalium-Ionen bei der entsprechenden Masse detektiert. Glucose ( $m/z$  203, 219) und Saccharose ( $m/z$  365, 381) gaben klare Signale als  $[M+Na]^+$ - und  $[M+K]^+$ -Addukte. Es wurden keine protonierten Ionen dieser Zucker beobachtet. Besonders Lysin gab starke Signale. Dies ist vermutlich auf die beiden Aminogruppen des Moleküls zurückzuführen, die im Positiv-Mode durch die Ionisation leicht geladen werden können. Die Kontrolle mit reinem DHB ergab keine isobaren Überlagerungen zwischen Analyt und Matrix. Die Hauptionen, die mit DHB detektiert wurden waren:  $[DHB-H_2O]^+$  bei  $m/z$  136,  $[DHB-H_2O+H]^+$  bei  $m/z$  137,  $[DHB]^+$  bei  $m/z$  154,  $[DHB+H]^+$  bei  $m/z$  155,  $[DHB-H_2O+Na]^+$  bei  $m/z$  159,  $[DHB-H+Na]^+$  bei  $m/z$  176,  $[DHB+Na]^+$  bei  $m/z$  177,  $[DHB-H+2Na]^+$  bei  $m/z$  199 und möglicherweise das Umwandlungsprodukt der dimeren Ionen bei  $m/z$  273, 304 und 375. Das Verhältnis der protonierten Ionen zu den Ionen mit Natrium und Kalium hängt bzw. hing von den Proben- und den Analysen-Bedingungen ab. Die Menge an Ionen mit Kalium und Natrium nahm stark zu, wenn der Puffer mit diesen Ionen in den Proben vorhanden war. Gewöhnlich nahm die Zahl der verschiedenen Ionen mit wachsender Laserenergie zu, die für die Ionisation ver-

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

15

wendet wurde. Alle vier Verbindungen konnten gleichzeitig in einer Probe bestimmt werden. Die Intensität der einzelnen Verbindung ist dabei unterschiedlich, möglicherweise aufgrund ihrer heterogenen Verteilung in der Matrix. Die Signalintensität von 5 Glucose und Alanin kann durch höhere Laserenergien gesteigert werden. Zusätzliche m+1 Signale wurden für alle Analyten beobachtet. Dies spiegelt das Vorhandensein natürlicher Isotope von Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Sauerstoff in den Proben wieder. Die experimentellen m+1/m-Signalverhältnisse von 10 0,075±0,005 (Lysin), 0,038±0,005 (Alanin), 0,072±0,004 (Glucose) und 0,140±0,011 (Saccharose) korrelieren sehr gut mit den theoretischen Werten von 0,076 für Lysin, 0,038 für Alanin, 0,071 für Glucose und 0,142 für Saccharose. Unter den getesteten Matrixes ergab DHB die besten Ergebnisse besonders für Zucker. 15 Auch Sinapinsäure ergab gute Ergebnisse. Im negativ-Mode konnten keine Signale der Analyten erhalten werden.

Beispiel 2: Quantifizierung mit MALDI-TOF-MS und internem Standard

20

Die MALDI-TOF-Massenspektrum einer etwa 1:1 Mischung von 9 mM natürlich markiertem und 10 mM 95 %  $\alpha^{15}\text{N}$ -Lysin werden in Figur 1c wiedergegeben. Die Signale bei m/z 147, 148 und 149 geben nicht-markierte, einfach-markierte und doppelt-markierte Isotopen- 25 fraktionen wieder. Die Signale bei m/z 147 und m/z 148 sind deutlich getrennt, so daß die zugehörigen Flächeneinheiten klar getrennt sind. Gleiches wurde für Alanin und Glucose (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Die Flächeneinheiten der Signale von m geben die Menge an nicht-markiertem Lysin und die von m+1 die Menge an 30 einfach-markiertem Lysin wieder. In der m+1-Fraktion sind auch natürliche Isotopen enthalten, die in den Ergebnissen enthalten sind und durch die theoretischen Werte korregiert werden müssen. Die Mengen werden mit Hilfe der folgenden Gleichungen quantifiziert:

35

$$I = \frac{S_{m+1, \text{analyte}} \cdot C_{\text{analyte}} + S_{m+1, \text{standard}} \cdot C_{\text{standard}}}{S_{m, \text{analyte}} \cdot C_{\text{analyte}} + S_{m, \text{standard}} \cdot C_{\text{standard}}} \quad (1)$$

40

$$C_{\text{analyte}} = C_{\text{standard}} \frac{(S_{m+1, \text{standard}} - S_{m, \text{standard}} \cdot I)}{(S_{m, \text{analyte}} \cdot I - S_{m+1, \text{analyte}})} \quad (2)$$

In den Gleichungen ist das Intensitätsverhältnis  $I = I_{m+1}/I_m$ , 45 die Konzentration von Analyt  $C_{\text{analyte}}$  und interner Standard  $C_{\text{standard}}$  die Sensitivität s. Die Sensitivität gibt die verschiedenen Massefraktionen einer Verbindung wieder. Beispielhaft ist die



Sensitivität von Lysin wiedergegeben. Natürlich markiertes Lysin besteht aus 92,9 % nicht-markierten und 7,1 % einfach-markierten Isotopomeren, höher markierte Isotopomere sind zu vernachlässigen. Der verwendete interne Standard 95 %  $\alpha^{15}\text{N}$ -Lysin weist drei Hauptmassefraktionen auf: nicht-markiertes Isotopomer (m),  $\alpha^{15}\text{N}$ -markiertes Isotopomer (m+1) und natürlich markiertes Isotopomer des einfach-markierten  $\alpha^{15}\text{N}$ -Lysin (m+2). Diese wurden mit jeweils 2,5 %, 90,6 % und 6,9 % quantifiziert. Dies führte zu den folgenden Sensitivitäten für Lysin:  $S_{m,\text{analyte}} = 0,929$ ,  $S_{m+1,\text{analyte}} = 0,071$ ,  $S_{m,\text{standard}} = 0,025$  und  $S_{m+1,\text{standard}} = 0,906$ .

Das Potential der MALDI-TOF-MS zur Quantifizierung wurde mit wäßrigen Mischungen natürlich markierter Verbindungen mit gleichen Mengen an internem Standard in einem Konzentrationsbereich des Analyten von 10  $\mu\text{M}$  bis 100 mM getestet. Der Vergleich der theoretischen und experimentell bestimmten Konzentrationen an Lysin, Alanin und Glucose (Figuren 2A - F, Quantifizierung in wäßriger Lösung) zeigt eine klare lineare Beziehung mit einem Regressionskoeffizienten von 1000 für jeden Analyt. Dies zeigt das Potential der MALDI-MS in Kombination mit markierten internen Standards zur Analyse der Konzentration kleiner chemischer Verbindungen. Die mittlere Standardabweichung über alle durchgeführten Versuche beträgt für Lysin 4,3 %, für Glucose 3,2 % und für Alanin 3,7 %. Die besten Ergebnisse zur Quantifizierung wurden mit einer Konzentration von Analyt zu internem Standard von etwa 1:1 erreicht. Gute Quantifizierungen waren aber auch noch bei einem Konzentrationsverhältnis von Analyt zu internem Standard zwischen 0,2 bis 5 möglich.

### Beispiel 3: Anwendung von MALDI-TOF-MS auf C. glutamicum ATCC 21253 Fermentationsbrühen

MALDI-TOF-MS-Messungen wurden zur Quantifizierung von Metaboliten in C. glutamicum ATCC 21253 Fermentationsbrühen verwendet. Der Lysin-produzierende Stamm wurde in PMB Mineralmedium mit einer anfänglichen Konzentration an 20 g/l Melasse und 18 g/l Glucose angezogen (Figuren 3a und 3b). In Figur 3a (Melasse) und 3b (Glucose) werden die Massenspektren von 1:5 verdünnten Kulturüberständen mit DHB als Matrix direkt nach der Inoculation wiedergegeben. Es konnten klare Signale der Substrate ermittelt werden. Sowohl Natrium- als auch Kalium-Addukte der beiden Verbindungen (Saccharose und Glucose) wurden bei m/z 203 und 219 (Glucose) und m/z 365 und 381 (Saccharose) gefunden. Keine Signale wurden bei den m/z-Werten für Lysin und Alanin gefunden, die erst während der Kultivierung gebildet werden. Ein Beispiel für ein MALDI-Spektrum am Ende der Kultivierung nach 40 Stunden ist in Figur 3c für das Wachstum auf Mineralmedium mit einer

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

17

Konzentration von anfänglich 18 g/l Glucose wiedergegeben. Das Glucose-Signal ist verschwunden. Die beiden Hauptprodukte des Stammes Alanin und Lysin können klar detektiert werden. Besonders hohe Signale resultieren vom Lysin, das als Hauptionen die Ionen  
 5  $[M+H]^+$  bei m/z 147,  $[M+Na]^+$  bei m/z 169 und  $[M+K]^+$  bei m/z 185 zeigt. Alanin wurde mit  $[M+H]^+$  bei m/z 90 bestimmt.

Die Figuren 4a und 4b zeigen das Profil nach 30 Stunden Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC 21253 in PMB Medium mit Glucose  
 10 (Figur 4a) und Melasse (Figur 4b). Glucose, Lysin und Alanin wurden wie oben beschrieben mit MALDI-TOF-MS und internem Standard und Messung des Zellwachstums als optische Dichte bei PD660 nm quantifiziert. Die Standardabweichung der Messungen (5\*50 Schüsse) wird in den Figuren wiedergegeben. Figur 5A bis 5D  
 15 gibt den Vergleich der MALDI-TOF-MS Quantifizierung von Lysin, Alanin und Glucose mit den Ergebnissen konventioneller analytischer Techniken wie HPLC (Lysin, Alanin) und enzymatischer Bestimmung (Glucose) wieder. Dieser Vergleich ergibt eine hervorragende Übereinstimmung zwischen der MALDI-TOF-MS und  
 20 den konventionellen Methoden über den gesamten Verlauf der Fermentation wieder. Der Regressionskoeffizient war in allen Fällen nahe 1. Besonders bei höheren Konzentrationen über 1 mM waren die Standardabweichungen bei der MALDI-TOF-MS-Messung kleiner als 5 %.

25

Der Stamm scheidet in beiden Medien Lysin aus und wächst in beiden Medien zunächst exponentiell. Mit dem Verbrauch der essentiellen Aminosäuren Methionin, Threonin und Isoleucin im Medium (Daten nicht gezeigt), stoppt das Wachstum und die Lysin-  
 30 produktion beginnt. Die Kinetik und die Stöchiometrie der beiden Kultivierungen waren signifikant unterschiedlich. 9,5 mM Lysin und 1,1 mM Alanin wurden auf definiertem Medium gebildet, auf Melasse-Medium wurden nur 3,5 mM Lysin und 1.0 mM Alanin gebildet. Das Gegenteil war der Fall für die Produktion der  
 35 Biomasse. Mit 4,3 g/l Biomasse wurden auf Mineralmedium 22 % weniger Biomasse gebildet als auf Melassemedium (5,5 g/l). *C. glutamicum* kann auf Melassemedium ohne die Aminosäuren Threonin, Methionin und Leucin bis zu einer Biomasse von 1,2 g/l wachsen.

40

Die gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen mit konventionellen Methoden und MALDI-TOF-MS zeigen die Möglichkeit der Anwendung dieser Methode für die Bioflux-Analyse von Organismen. Dabei hat die MALDI-TOF-MS-Methode eine Reihe von Vorteilen  
 45 gegenüber konventionellen Verfahren wie beispielsweise die schnellere Analysenzeit, die gleichzeitige Analyse sehr unterschiedlicher Verbindungen wie Aminosäuren und Zucker, die

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

18

Möglichkeit einer Analyse mit sehr kleinen Probenmengen bzw. Volumina.

Beispiel 4:

5

$^{13}\text{C}$ -Tracerexperimente mit Messung der Markierungsmuster von Stoffwechselprodukten durch MALDI-TOF-MS und stöchiometrischer Bilanzierung zur Bioflux-Analyse des Stoffwechsels von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253 in Batch-Kultivierung.

10

Das folgende Beispiel zeigt die Bestimmung von Biofluxparametern des Stoffwechsels des Lysin-produzierenden Mikroorganismus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253.

15 Definition einzelner im Beispiel verwendeter Begriffe zur  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Stoffen

Durch unterschiedliche Anzahl und Positionen von  $^{13}\text{C}$ -Atomen in einer Substanz ergeben sich verschiedene Positionsisotopomere.

20 Eine Substanz mit  $n$  Kohlenstoffatomen besitzt demnach  $2^n$  verschiedene Positionsisotopomere. Positionsisotopomere gleicher Masse, die also eine identische Anzahl an  $^{13}\text{C}$ -Atomen aufweisen, deren genaue Position im Molekül jedoch verschieden sein kann, bilden Gruppen von Massenisotopomeren. Die Anteile einzelner

25 Gruppen von Massenisotopomeren können mit Massenspektrometrie gemessen werden. Es ergibt sich dabei ein charakteristisches Massenspektrum mit einzelnen Peaks, die verschieden schwere Massenisotopomergruppen widerspiegeln. Die relative Häufigkeit zweier Massenisotopomerengruppen der Massen  $m_1$  und  $m_2$  zueinander

30 bezeichnet man als Intensitätsverhältnis  $I_{m1/m2}$ . Intensitätsverhältnisse können durch Vergleich von Peakhöhen oder Peakflächen der entsprechenden Massenisotopomergruppen bestimmt werden.

35 Die Kultivierung und Analytik erfolgte, wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben.

Ergänzung zur Kultivierung: Als Substrat wurde  $^{13}\text{C}$ -markierte Glucose eingesetzt, wobei zwei parallele Ansätze durchgeführt

40 wurden. Im einen Ansatz wurde als Substrat 99% 1- $^{13}\text{C}$ -Glucose (Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich) eingesetzt. Im anderen Ansatz wurde als Substrat ein Gemisch von natürlich markierter Glucose (Sigma, St. Louis, USA) zu 99 % U- $^{13}\text{C}$ -Glucose (Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich) im molaren Verhältnis 37,5 : 62,5  
45 eingesetzt. Proben, die nach etwa 17 Stunden Kultivierungszeit gegen Ende der Lysinproduktionsphase gezogen wurden, wurden

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

19

anschließend mit MALDI-TOF-MS auf die Markierungsmuster der gebildeten Produkte Lysin, Acetat und Trehalose analysiert.

Gegenüber der unter den Beispielen allgemein beschriebenen MALDI-  
5 Analytik wurden folgende Änderungen vorgenommen: Pro Probe wurden die Signale von 100 x 5 Schüssen aufsummiert. Mit der Gerätesoftware XMass (Bruker Daltonics, Bremen) wurden für jeden Metaboliten die relativen Peakhöhen der einzelnen Massenisotopomere bestimmt.

10

Ergebnisse:

Kultivierungsverlauf der Batch-Fermentation von *C. glutamicum* ATCC 21253

15

Nach etwa 7 Stunden Kultivierung begann mit dem Verbrauch der essentiellen Aminosäuren Threonin, Leucine und Methionin die Bildung von Lysin und verschiedenen Nebenprodukten wie Alanin, Valin, Acetat, Lactat, Pyruvat und Trehalose. Aus den gemessenen  
20 Konzentrationen von Substrat, Produkten und Biomasse nach 7 und 17 Stunden Kultivierungsdauer wurden Bildungs- und Verbrauchs-raten für den Zeitraum der Lysinbildung bestimmt. Daraus wurden auf das Substrat bezogene Ausbeutekoeffizienten (in mmol/mmol Glucose) errechnet. Der Bedarf einzelner Intermediärmetabolite  
25 für die Biomassessynthese wurde über den experimentell bestimmten Biomasse-Yield (in g Biotrockenmasse/mmol Glucose) sowie Daten zur Biomassezusammensetzung von *C. glutamicum* (Marx, A., de Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L und Sahm, H., 1996, Bio-technology & Bioengineering, 49: 111-129) ermittelt. Tabellen 1  
30 und 2 zeigen die Mittelwerte aus den parallel durchgeführten Tracerexperimenten. Das Hauptprodukt Lysin wird mit einem Yield von 0.225 mol/mol gebildet. Daneben produziert der Stamm eine Reihe von Nebenprodukten mit geringeren Anteilen.

35 Bestimmung der Markierungsmuster von Metaboliten mit MALDI-TOF-MS

Optimale Signale erhielt man für die Messung der Markierungsmuster von Trehalose und Lysin mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix. Fig. 6 zeigt ein MALDI-TOF-MS-Spektrum von Lysin aus dem  
40 Tracerexperiment mit einem Gemisch aus U-<sup>13</sup>C-Glucose und natürlich markierter Glucose (37.5:62.5), welches als [M+H]<sup>+</sup>-Addukt mit 2,5-DHB als Matrix im positiven Reflektormode aufgenommen wurde. Man erkennt deutlich die verschiedenen gebildeten Massenisotopomere wie zum Beispiel die der Massen 147 (m), 148 (m+1), 149  
45 (m+2) oder 150 (m+3). Fig. 7. zeigt ein MALDI-TOF-MS-Spektrum von Acetat aus einem Tracerexperiment mit 99 % 1-<sup>13</sup>C-Glucose aus dem negativen Reflektormode mit 2,5-DHB als Matrix. Für beide Messun-

gen wurde Fementationsbrühe aus 17 h Batch-Kultur von *C. glutamicum* ATCC21253 genommen. Neben dem Hauptpeak des nicht markierten Acetats bei der Masseladungszahl  $m/z$  59 als  $[M-H]^-$ -Addukt, sind die anderen gebildeten Massenisotopomere  $m+1$  ( $m/z$  60) und  $m+2$  ( $m/z$  61) zu erkennen. Die Intensitätsverhältnisse wurden den durch Vergleich der jeweiligen Peakhöhen mit der Bruker-Software XMass ermittelt. Folgende Intensitätsverhältnisse wurden für Metabolite mit  $1-^{13}\text{C}$ -Glucose als Tracersubstrat bestimmt:  $I_{m+1/m}$ , Lysin = 1.113 und  $I_{m+1/m+2}$ , Trehalose = 0.422 (siehe Tab. 3). Für das Gemisch aus  $\text{U}^{12}/\text{U}^{13}\text{C}$ -Glucose wurden die Intensitätsverhältnisse  $I_{m+1/m}$ , Lysin = 0.89,  $I_{m+2/m+1}$ , Lysin = 1.28,  $I_{m+1/m}$ , Acetat = 0.120 und  $I_{m+1/m+2}$  Acetat = 0.211 gemessen. Die Fehler der jeweiligen Messungen lagen zumeist im Bereich von 5 - 10 %. Diese Intensitätsverhältnisse wurden für die Bioflux-Berechnung herangezogen.

15

#### Bioflux-Berechnung

Mit Hilfe eines Modells des zentralen Metabolismus von *C. glutamicum* in der Software Matlab/Simulink (Wittmann und Heinzle, 1999, Biotechnology & Bioengineering: 62: 739-750; Wittmann und Heinzle, Abstract, 9th European Congress of Biotechnology, Brüssel, Belgien, Juli 1999) wurde die intrazelluläre Flußverteilung aus den experimentell bestimmten Markierungsmustern der Metabolite sowie den stöchiometrischen Daten der Kultivierungen (siehe Tab. 1 und Tab. 2) berechnet. Als Ausnahme wurde aus den stöchiometrischen Daten der experimentelle Yield von Lysin nicht berücksichtigt. Vielmehr wurde der aus der Bioflux-Analyse bestimmte Lysin-Yield mit dem experimentellen Wert verglichen, um die Konsistenz der Daten zu überprüfen.

30

Die gemessenen Intensitätsverhältnisse lassen sich zur Bestimmung verschiedener Flußparameter heranziehen. Dies ergaben Simulationen des Stoffwechsels von *C. glutamicum*, die zuvor mit einem in Matlab/Simulink entwickelten Modell durchgeführt worden waren. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tab. 3 dargestellt. Mit  $1-^{13}\text{C}$ -Glucose als Tracersubstrat lassen sich aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+1/m}$  von Lysin das Verzweigungsverhältnis zwischen Glycolyse und Pentosephosphat-Weg ( $\Phi_{\text{PPP}}$ ) und aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+2/m+1}$  von Trehalose die Reversibilität von Glucose-6-phosphat-Isomerase ( $\zeta_{\text{PGI}}$ ) bestimmen. Mit einem Gemisch aus natürlich markierter und  $\text{U}-^{13}\text{C}$ -Glucose als Tracersubstrat lassen sich aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+1/m}$  von Lysin das Verzweigungsverhältnis zwischen Carboxylierung von Pyruvat/Phosphoenolpyruvat sowie dem Einschleusen von Pyruvat in den Citrat-40 Zyklus, ( $\Phi_{\text{Fyc}}$ ), aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+2/m+1}$  von Lysin das Verzweigungsverhältnis zwischen Succinylase und Dehydrogenase-Weg in der Lysinbiosynthese, und aus dem Intensitätsverhältnis

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 21

$I_{m+1/m}$  von Acetat oder Alanin oder anderen aus Pyruvat gebildeten Metaboliten der Austauschfluß zwischen Pyruvat/Phosphoenolpyruvat und Oxalacetat ( $\zeta_{PC/PEPCK}$ ) bestimmen.

- 5 Die jeweiligen Parameteranpassungen wurden mit einem Gradient-solver der Software Matlab (fmincon) durchgeführt, in verschiedenen Anpassungen wurden dabei die Startwerte der Parameter variiert, um das Auffinden totaler Minima zu ermöglichen. In allen Fällen konvergierte der Algorithmus zu den gleichen End-
- 10 werten für die zu bestimmenden Parameter. Das Kriterium der Güte der Anpassung war in allen Fällen die Summe der Quadrate der Abweichung zwischen Modellresultaten und experimentellen Resultaten (least square).
- 15 In allen Anpassungen wurden die stöchiometrischen Daten in Tab. 1 und Tab. 2 berücksichtigt. Folgende Flußparameter wurden nicht bestimmt und Literaturdaten, die Tracer- Experimente von *C. glutamicum* in kontinuierlicher Kultur mit NMR beschreiben, entnommen: Reversibilität der Transketolase I ( $\zeta_{tk1} = 2,50$ ),
- 20 Reversibilität der Transketolase II ( $\zeta_{tk2} = 0,50$ ), Reversibilität der Transaldolase ( $\zeta_{ta} = 1,00$ ).

- Die Berechnung der Flüsse aus den experimentellen Daten erfolgte folgendermaßen: Es wurden zunächst für das Tracerexperiment mit
- 25  $1-^{13}C$ -Glucose aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+1/m}$  von Lysin das Verzweigungsverhältnis zwischen Glycolyse und Pentosephosphat-Weg ( $\Phi_{PPP}$ ) und aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+2/m+1}$  von Trehalose die Reversibilität von Glucose-6-phosphat-Isomerase ( $\zeta_{PGI}$ ) ermittelt. Die beiden Flußparameter wurden dann an die nächste Parameter-
- 30 bestimmung übergeben, die für das Experiment mit dem Gemisch aus natürlich markierter und  $U-^{13}C$ -Glucose als Tracersubstrat aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+1/m}$  von Lysin das Verzweigungsverhältnis zwischen Carboxylierung von Pyruvat/Phosphoenolpyruvat und dem Einschleusen von Pyruvat in den Citrat-Zyklus, ( $\Phi_{PYC}$ ), und aus dem
- 35 Intensitätsverhältnis  $I_{m+2/m+1}$  von Lysin das Verzweigungsverhältnis zwischen Succinylase und Dehydrogenase-Weg in der Lysinbiosynthese berechnete. Die Ergebnisse wurden dann in einer dritten Schleife übernommen und für die Bestimmung des Austauschflusses zwischen Pyruvat/Phosphoenolpyruvat und Oxalacetat ( $\zeta_{PC/PEPCK}$ ) aus
- 40  $I_{m+1/m}$  von Acetat und  $I_{m+1/m+2}$  von Acetat verwendet. Die drei Parameteranpassungen wurden solange hintereinander durchlaufen, bis keine signifikante Änderung der Ergebnisse mehr zu beobachten war. Dies war nach 3 Durchläufen erreicht.

## 22

Fig. 8 zeigt die resultierende Flußkarte für die Phase der Lysinbildung. Folgende interessante Schlußfolgerungen für Batch-Kultur zwischen 7 und 17 h Kultivierungsdauer von *C. glutamicum* ATCC21253 lassen sich unter anderem aus den Daten ziehen:

5

(1) Der relativ hohe Fluß in den Pentosephosphat-Weg ( $\Phi_{PPP} = 0.69$ ) stellt ausreichend NADPH für die Lysinsynthese zur Verfügung.

10 (2) Beide alternativen Stoffwechselwege in der Lysinbiosynthese sind aktiv.

(3) Es resultiert ein signifikanter Rückfluß von Oxalacetat zu den Pools von Pyruvat/Phosphoenolpyruvat. Der dadurch ablaufende "futile cycle" könnte zum Abbau von überschüssigem ATP genutzt werden.

20 (4) Der Citratcyclus läuft mit hoher Aktivität ab, offensichtlich wird eine hohe Menge an Energieäquivalenten erzeugt, die aufgrund des zum Erliegen kommenden Wachstums während der Lysinbildung unter Umständen über den "futile cycle" zwischen Oxalacetat und Pyruvat/Phosphoenolpyruvat verbraucht werden.

(5) Das Enzym Glucose-6-phosphat-Isomerase ist stark reversibel.

25 Der über die Bioflux-Analyse bestimmte Lysin-Yield von 0.202 mol/mol zeigt exzellente Übereinstimmung mit dem experimentell gefundenen Wert von 0.224 mol/mol. Dies unterstreicht die Konsistenz der Daten.

30

#### Zusammenfassung von Beispiel 4

Mit der vorliegenden Methode läßt aus wenigen gezielten Analysen von Intensitätsverhältnissen von Metaboliten in Tracer-experimenten der Zentralstoffwechsel des Lysinproduzenten *Corynebacterium glutamicum* nahezu vollständig quantifizieren. Insbesondere die Schlüsselparameter der Lysinbildung wie Verzweigungsverhältnis zwischen Glycolyse und Pentosephosphat-Weg ( $\Phi_{PPP}$ ), Reversibilität von Glucose-6-phosphat-Isomerase ( $\zeta_{PGI}$ ), dem Verzweigungsverhältnis zwischen Carboxylierung von Pyruvat/Phosphoenolpyruvat und dem Einschleusen von Pyruvat in den Citrat-Zyklus, ( $\Phi_{PYC}$ ), Verzweigungsverhältnis zwischen Succinylase und Dehydrogenase-Weg in der Lysinbiosynthese sowie Austauschflüsse zwischen Pyruvat/Phosphoenolpyruvat und Oxalacetat ( $\zeta_{PC/PEPCCK}$ ) können mit der entwickelten Methode bestimmt werden, was für die Charakterisierung und Stammverbesserung von Lysinproduzierenden Bakterien essentiell ist.

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

23

Tab. 1: Ausbeutekoeffizienten für Biomasse (in g/ mmol Glc) und verschiedene Produkte in (in mol/mol) in Batch-Kultivierungen von *C. glutamicum* ATCC 21253 während der Lysinbildung.

5

Komponente	Ausbeute-Koeffizient
Biomasse	0,05985
Trehalose	0,0169
10 Alanin	0,0170
Valin	0,0293
Lactat	0,0044
15 Acetat	0,0274
Pyruvat	0,0063
Lysine	0,2247

20 Tab. 2: Precursor-Bedarf für die Biomassessynthese in Batch-Kultivierungen von *C. glutamicum* ATCC 21253 während der Lysinbildung.

25

Precursor für BTM	Verbrauch (mol/mol Glucose)
Glucose-6-phosphat	0,012
Fructose-6-phosphat	0,004
Ribose-5-phosphat	0,053
30 Phosphoglycerat	0,077
Erythrose-4-phosphat	0,016
Phosphoenolpyruvat	0,032
Pyruvat	0,108
35 Glycerinaldehyd-3-phosphat	0,077
a-Ketoglutarat	0,102
Oxalacetat	0,075
40 Acetyl-CoA	0,150

45



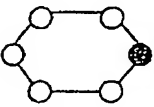
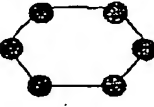
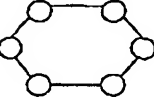
WO 01/94910

PCT/EP01/06415

24

Tab. 3: Experimentelles Design zur Bioflux-Analyse Schlüsselparametern des Stoffwechsels von *C. glutamicum*: Geeignete Auswahl von Tracersubstrat und gemessenem Intensitätsverhältnis.

5

10		$I_{m+1/m}$ , lysine	$\Phi_{PPP}$	1,113
		$I_{m+1/m+2}$ , trehalose	$\zeta_{PGI}$	0,422
15		$I_{m+1/m}$ , lysine	$\Phi_{PYC}$	0,89
		$I_{m+2/m+1}$ , lysine	$\Phi_{DH}$	1,28
20		$I_{m+1/m}$ , acetate	$\zeta_{PC/PEPCK}$	0,120

#### Beispiel 5:

25 Screening nach metabolischen Aktivitäten in Mikrotiterplatten  
-  $^{13}C$ -Tracerexperimente mit Messung der Markierungsmuster von  
Stoffwechselprodukten durch MALDI-TOF-MS zur Bioflux-Analyse  
von verschiedenen Lysin-produzierenden Mikroorganismen.

30 Das folgende Beispiel zeigt das Screening nach metabolischen  
Aktivitäten in Mikrotiterplatten mit MALDI-TOF-MS am Beispiel der  
Bestimmung des Verzweigungsverhältnisses zwischen Glycolyse und  
Pentosephosphat-Weg für 4 verschiedene Lysin-produzierende Mikro-  
organismen.

35 Mikroorganismen

Als Stämme wurden die Lysin-produzierenden Mikroorganismen *Brevi-  
bacterium flavum* NRRL 11478, *Corynebacterium glutamicum* ATCC  
21253, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21526 und *Corynebacterium*  
40 *glutamicum* ATCC 21544 verwendet.

Die Kultivierung erfolgte, wie in den vorherigen Beispielen  
beschrieben, wobei folgende Ergänzungen und Abweichungen vor-  
genommen wurden:

45

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 25

Die Kultivierung der Organismen erfolgte in Mikrotiterplatten, die in einem Reader (Fluoroscant Ascent FL, Labsystems, Finnland) über 24 Stunden bei 30 °C inkubiert wurden. Inokulum und Medium wurden direkt vor dem Versuch gemischt und mit einer Pipette in die Mikrotiterplatte eingefüllt. Als Kohlenstoffquelle wurde 99 %  $1-^{13}\text{C}$ -Glucose (Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich) eingesetzt. Es wurden die in der Plattenmitte liegenden Wells zur Kultivierung verwendet. Nicht benutzte Wells der Platten am Außenrand wurden mit Wasser gefüllt, um die Luftfeuchtigkeit im Reader zu erhöhen. Die Platten wurden während der Inkubation ständig geschüttelt (Orbitalschüttler, Schüttelgeschwindigkeit 1020 rpm, Schütteldurchmesser 1 mm). Das Kultivierungsvolumen betrug zu Beginn jeweils 200  $\mu\text{l}$ , und nahm durch Verdunstung unter Versuchsbedingungen etwa 2 % pro Stunde ab. Zum Vergleich wurden Parallelexperimente in 25 ml Schüttelkolben mit Schikanen und 5 ml PMB-Medium durchgeführt, die bei 150 rpm und 30°C inkubiert wurden.

Nach 24 Stunden wurden die Inkubationen beendet, es wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  Probe aus den Wells und den Schüttelkolben entnommen und mit MALDI-TOF-MS auf das Markierungsmuster des gebildeten Lysins untersucht.

## Analytik

25

Mit MALDI-TOF-MS wurde das Intensitätsverhältnis  $I_{m+1}/I_m$  von Lysin aus 1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnten Proben gemessen. Die Vorgehensweise war analog dem Beispiel zur Lysin-Markierungsmessung im Beispiel Bioflux-Analyse.

30

Im Unterschied zur vorherig beschriebenen Analytik wurden folgende Änderungen vorgenommen:

Es wurden jeweils 30 x 5 shots pro Probe aufsummiert.

35

Bestimmung der Markierung von Lysin mit MALDI-TOF-MS.

Optimale Signale erhielt man für die Messung von Lysin mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix. Die im einzelnen erhaltenen Meßwerte für die verschiedenen untersuchten Stämme sind in Tab. 4 dargestellt.

## Bioflux-Berechnung

45 Mit Hilfe eines Modells des zentralen Metabolismus von *C. glutamicum* in der Software Matlab/Simulink (Wittmann und Heinzle, 1999, Wittmann und Heinzle, 1999) wurde das Verzweigungsverhält-

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 26

nis zwischen Glycolyse und Pentosephosphat-Weg aus dem experimentell bestimmten Markierungsmuster von Lysin berechnet. Stöchiometrische Informationen zur Biomassebildung wurden nicht berücksichtigt. Wie zuvor durchgeführte Simulationen des Stoffwechsels von *C. glutamicum* mit einem in Matlab/Simulink entwickelten Modell ergaben, läßt sich mit 1-<sup>13</sup>C-Glucose als Tracersubstrat aus dem Intensitätsverhältnis  $I_{m+1/m}$  von Lysin das Verzweigungsverhältnis zwischen Glycolyse und Pentosephosphat-Weg ( $\Phi_{PPP}$ ) bestimmen. Die gute Sensitivität dieses Ansatzes resultiert aus der Tatsache, daß das C<sub>1</sub>-Atom der Glucose im Pentosephosphat-Weg als CO<sub>2</sub> abgespalten wird, während es in der Glycolyse im Kohlenstoffskellet der Metabolite konserviert bleibt. Steigende Flüsse in den Pentosephosphat-Weg führen somit zu einer zunehmenden Abnahme der Markierung im Lysin.

15

Die Parameteranpassung wurde mit einem Gradientsolver der Software Matlab (fmincon) durchgeführt, in verschiedenen Anpassungen wurden dabei die Startwerte der Parameter variiert, um das Auffinden totaler Minima zu ermöglichen. Das Kriterium der Güte der Anpassung war in allen Fällen das Quadrat der Abweichung zwischen Modellresultaten und experimentellen Resultaten (least square). In allen Fällen konvergierte der Algorithmus zu den gleichen Endwerten für den zu bestimmenden Parameter. In diesem Experiment nicht bestimmte Flußparameter wurden entsprechend eigenen Ergebnissen oder Literaturdaten (siehe Patentbeispiel zur Bioflux-Analyse) entnommen.

Tab. 4 zeigt die erhaltenen Werte für ( $\Phi_{PPP}$ ). Man erkennt, daß in allen Fällen relative hohe Flüsse in den Pentosephosphat-Weg resultieren, so daß eine Limitierung der Lysinbildung durch NADPH unwahrscheinlich ist. Interessanterweise zeigten die verschiedenen untersuchten Lysinproduzenten eine gute Übereinstimmung bezüglich  $\Phi_{PPP}$ . Auch zwischen den Experimenten in Mikrotiterplatten und in Schüttelkolben resultierten keine nennenswerten Unterschiede bezüglich  $\Phi_{PPP}$ . Weitere Untersuchungen zur Menge des gebildeten Lysins ergaben, daß Stämme NRRL 11478, ATCC 21526 und ATCC 21544 in Schüttelkolben und Mikrotiterplatten-Kultivierung praktisch gleichviel Lysin produzierten (Daten nicht gezeigt), wohingegen der Stamm ATCC 21253 in der Mikrotiterplatte nach 24 Stunden nur etwa 30 % der Lysinmenge wie im Schüttelkolben produzierte.

## Zusammenfassung von Beispiel 5

Mit der vorliegenden Methode lassen sich metabolische Charakterisierungen von Mikroorganismen im Mikromaßstab durchführen, was anhand eines Stammvergleiches von 4 verschiedenen Lysinproduzenten

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 27

ten demonstriert wurde. Dies wird durch die eingesetzte MALDI-TOF-MS-Analytik erreicht, die nur geringste Probenmengen von < 1 µl benötigt. Mit gezielten Analysen von Intensitätsverhältnissen von Metaboliten in Tracerexperimenten lassen sich sogar Fluß-  
 5 verteilungen im Stoffwechsel quantifizieren. Zudem kann die MALDI-TOF-MS-Analytik für die Konzentrationsbestimmung verwendet werden siehe Beispiel zur Konzentrationsbestimmung aus Fermentationsbrühen von *C. glutamicum* (Bsp. 3), was für die Ermittlung von Produktbildungs-  
 10 raten oder Ausbeutekoeffizienten bei Kultivierung von Mikroorganismen in Mikrotiterplatten einsetzbar ist. Damit eignet sich die Methode sehr gut für das Screening von Stämmen.

15 Tab. 1: Screening von Lysin-produzierenden Mikroorganismen in Mikrotiterplatten und Schüttelkolben mit 1-<sup>13</sup>C-Glucose als Substrat: Intensitätsverhältnis  $I_{m+1/m}$  von Lysin und relativer Fluß in den Pentosephosphat-Weg

20 Mikroorganismus	Mikrotiterplatte		Schüttelkolben	
	Lysin $I_{m+1/m}$	relativer Fluß in PPP (%)	Lysin $I_{m+1/m}$	relativer Fluß in PPP (%)
B. flavum NRRL 11478	1,39	55	1,38	56
25 C. glutamicum ATCC 21526	1,31	61	1,35	57
C. glutamicum ATCC 21544	1,44	52	1,40	55
30 C. glutamicum ATCC 21253	1,43	53	1,38	56

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse  
5 komplexer Gemische chemischer Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die  
10 Gemische chemischer Verbindungen in einer chemischen oder enzymatischen Reaktion oder in einem fermentativen Prozeß entstehen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß  
15 die Gemische der chemischen Verbindungen aus polymeren oder nichtpolymeren Verbindungen oder polymeren und nichtpolymeren Verbindungen bestehen.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein interner Standard, vor Beginn der  
20 chemischen oder enzymatischen Reaktion oder des fermentativen Prozesses oder während oder nach Abschluß der chemischen oder enzymatischen Reaktion oder des fermentativen Prozesses zugesetzt wird und das Gemisch der chemischen Verbindungen  
25 in Gegenwart dieses internen Standards analysiert wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse der Gemische während oder nach der  
30 chemischen oder enzymatischen Reaktion oder des fermentativen Prozesses mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie erfolgt.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß im Gemisch nichtpolymere Verbindungen mit  
35 einer Molmasse < 4000 Dalton analysiert werden.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die im Gemisch vorhandenen nichtpolymeren  
40 Verbindungen in einer Konzentration von 1 µM bis 500 mM vorliegen.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse auf einem Trägermaterial mit  
45 einer Rauigkeitswert  $R_z > 1$  durchgeführt wird.

Zeichn.

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

## 29

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse auf einem poliertem, beschichtetem oder bedampften Trägermaterial oder auf einem poliertem und beschichtetem oder poliertem und bedampften Trägermaterial durchgeführt wird. . . . .  
5
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger aus einem Material ausgewählt aus der Gruppe Glas, Keramik, Quarz, Metall, Stein, Kunststoff, Gummi, Silicium, Germanium oder Porzellan besteht.  
10
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen im Gemisch vor der Analyse derivatisiert werden.  
15
12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren manuell oder automatisch durchgeführt wird.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in einem High Throughput Screening verwendet wird.  
20
14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren zur Bioflux-Analyse verwendet wird.  
25
15. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß ein interner Standard vorher dem fermentativen Prozess zugesetzt wird und das dieser Standard als Substrat im fermentativen Prozess umgesetzt wird, wobei die Isotopomerenverteilung der entstehenden Zwischenprodukte oder Produkte oder Zwischenprodukte und Produkte mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie gemessen wird.  
30
16. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß als interner Standard durch mindestens ein Isotop ausgewählt aus der Gruppe  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{30}\text{Si}$ ,  $^{74}\text{Se}$  oder deren Mischungen markiertes Edukt, Produkt oder eine weitere markierte chemische Verbindung verwendet wird.  
35  
40
17. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse zusätzlich mit Hilfe des metastabilen Zerfalls nach der Ionisierung oder des stoß-induziertem Zerfalls erfolgt.  
45

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

30

18. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 17, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die Dynamik der Markierungsmuster und  
Konzentration der Substanzen in der chemischen oder  
enzymatischen Reaktion oder im fermentativen Prozeß  
gemessen wird.

10

15

20

25

30

35

40

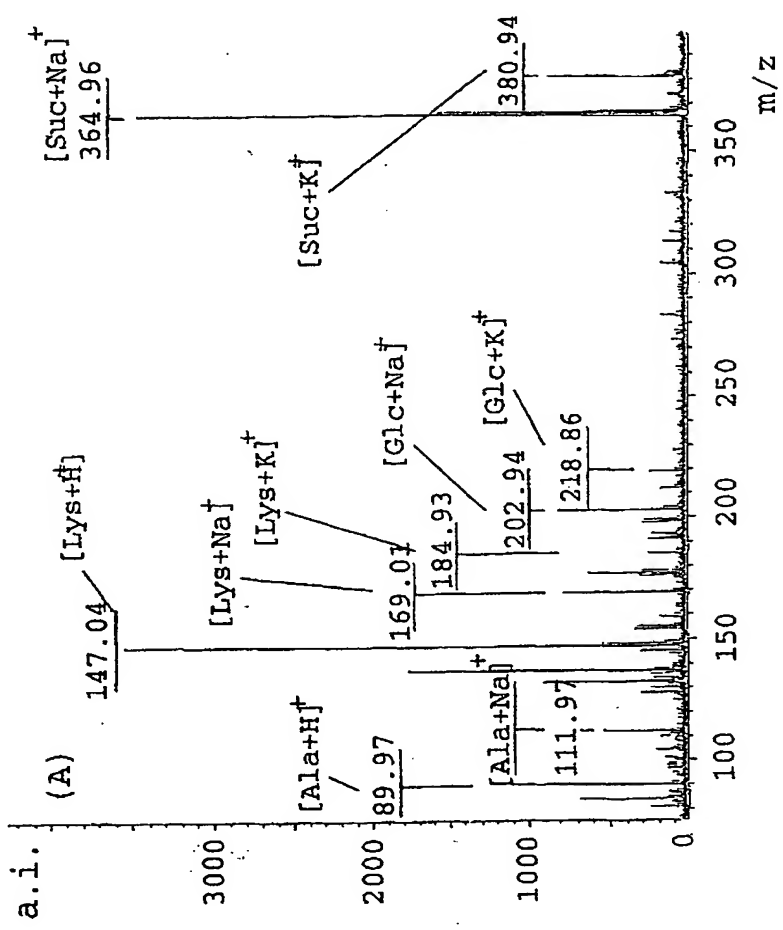
45

WO 01/94910

PCT/EP01/06415

1/20

Figur 1a: Mischung aus je 2,5 mM Lysin, Alanin, Glucose und Saccharose mit 2,5-DHB als Matrix in deionisiertem Wasser (positiv Reflectormodus)



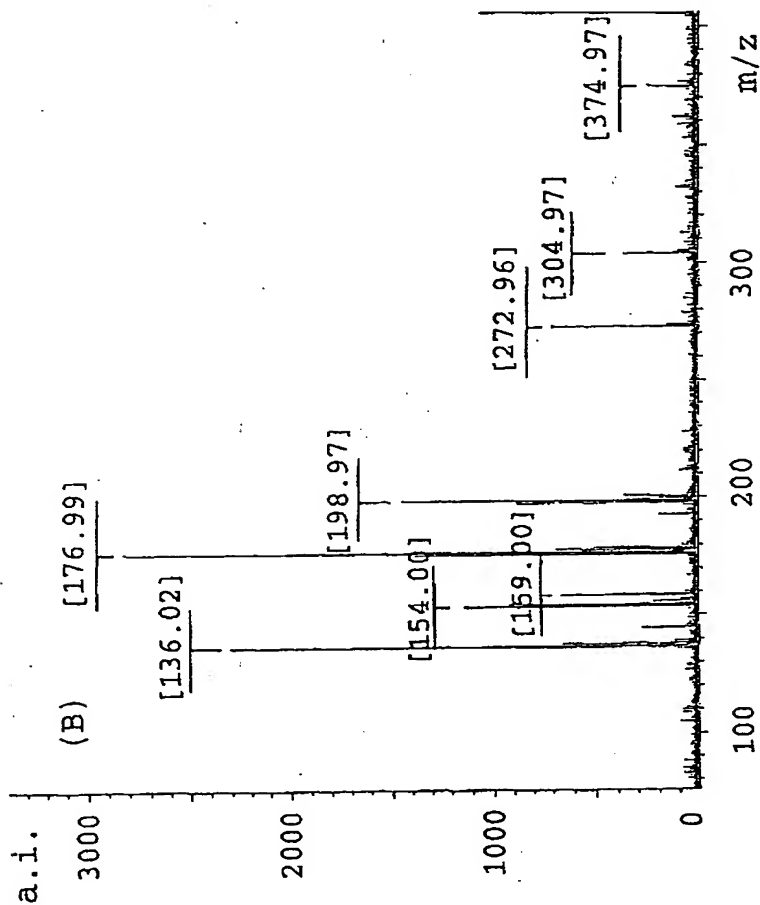


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

2/20

Figur 1b: MALDI-TOF-MS-Spektrum von reinem deionisiertem Wasser mit 2,5-DHB als Matrix (positiv Reflectormodus)

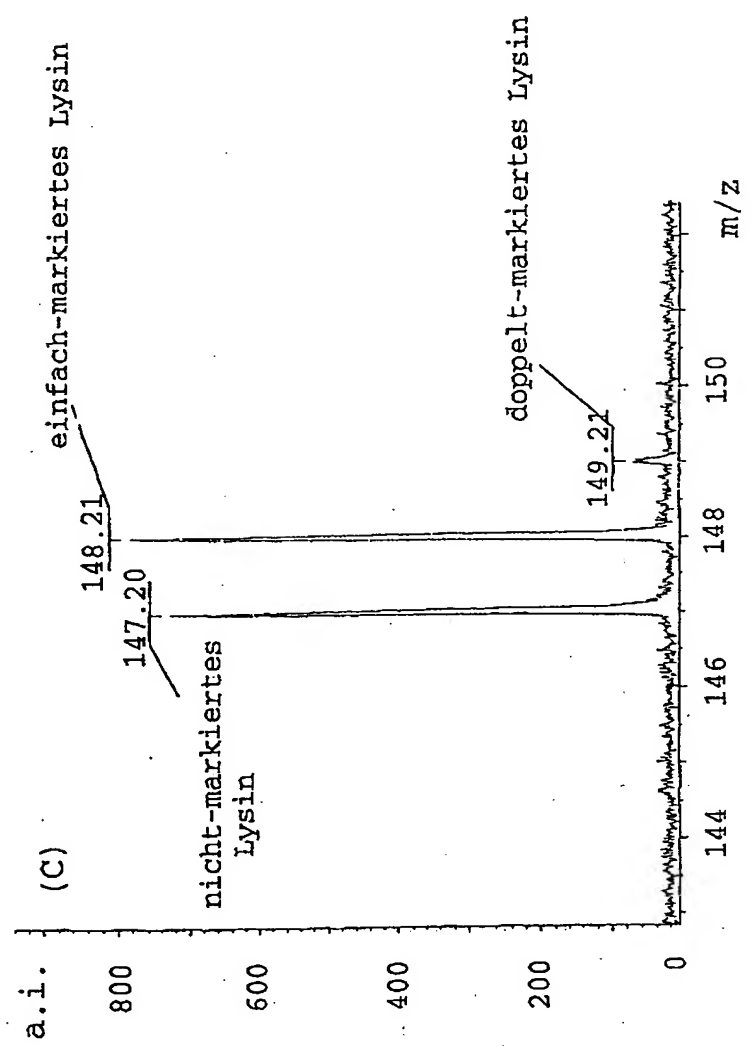


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

3/20

Figur 1c: MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung von 9 mM natürlich markiertem und 10 mM 95%  $\alpha^{15}\text{N}$ -Lysin mit 2,5-DHB als Matrix (positiv Reflectormodus)

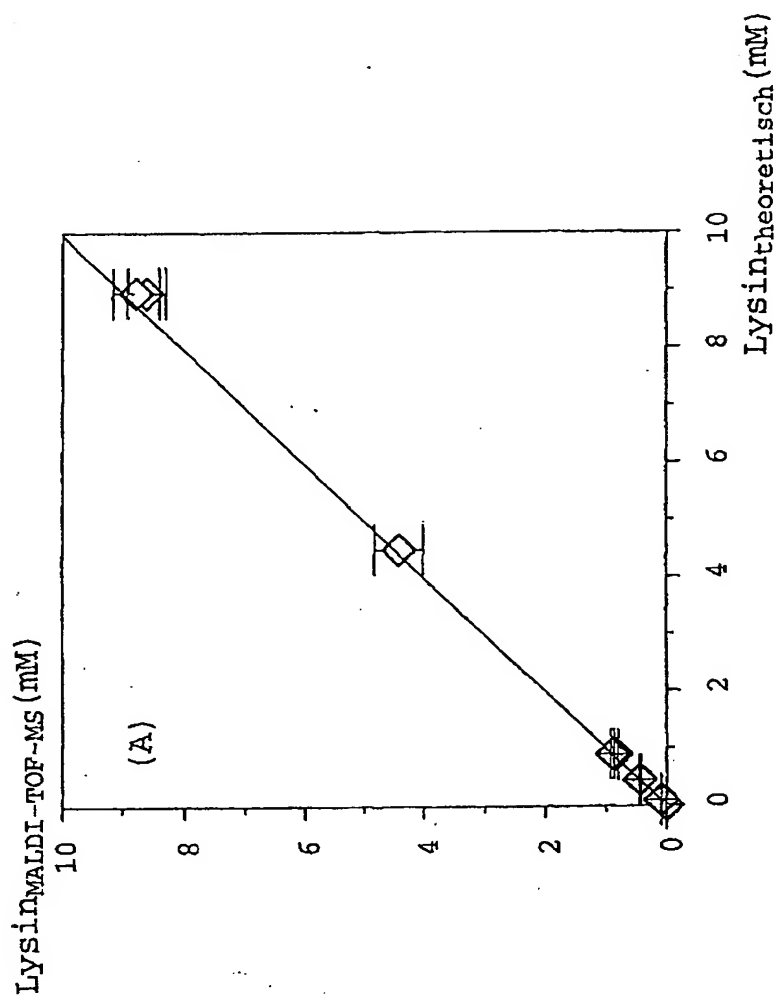


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

4/20

Figur 2a: Korrelation zwischen gemessenen Lysin-Konzentrationen und den theoretischen Lysin-Konzentrationen (je 0 bis 10 mM)

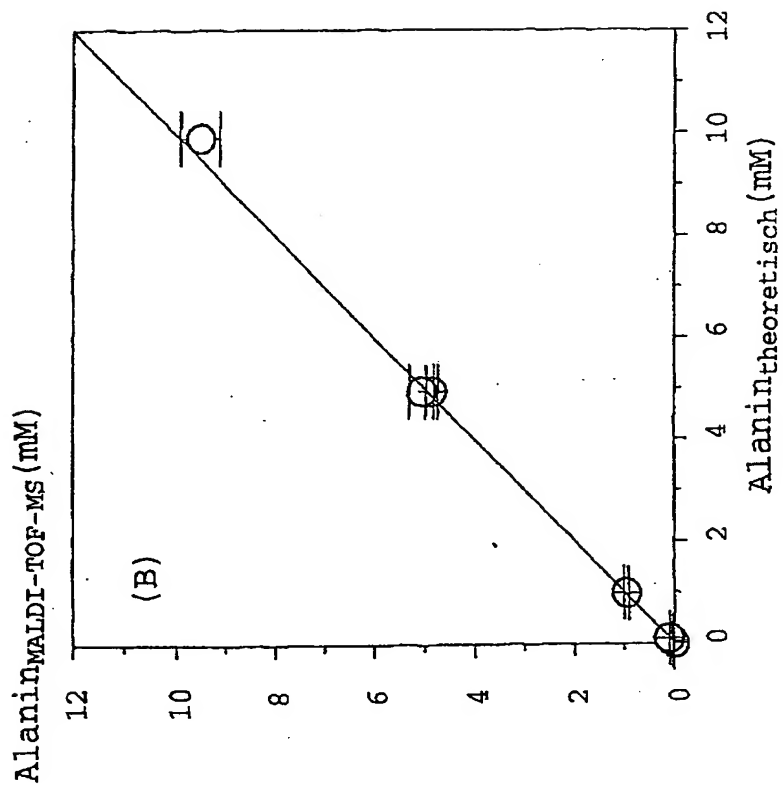


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

5/20

Figur 2b: Korrelation zwischen gemessenen Alanin-Konzentrationen und den theoretischen Alanin-Konzentrationen (je 0 bis 12 mM)

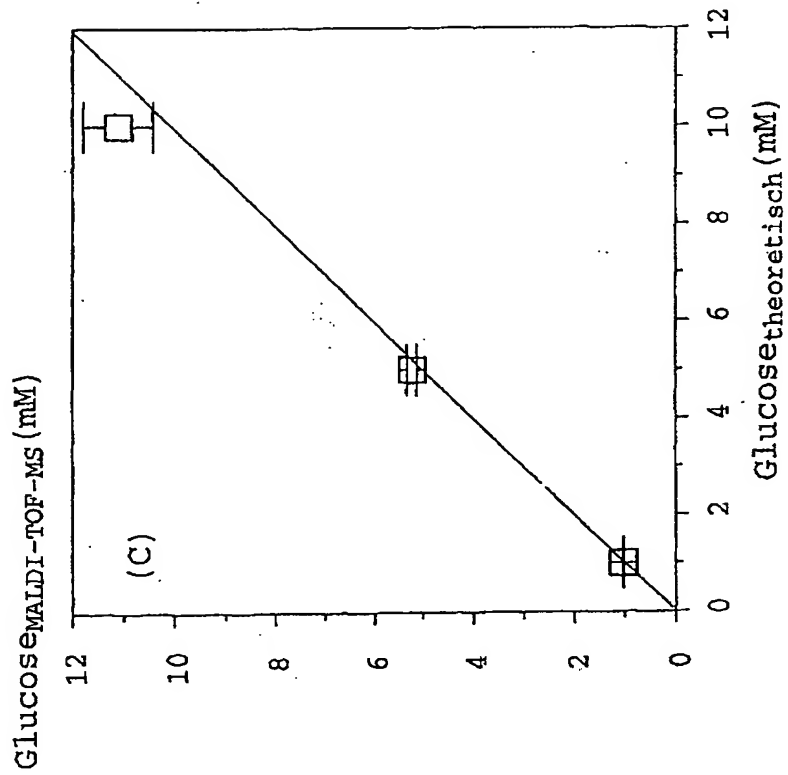


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

6/20

Figur 2c: Korrelation zwischen gemessenen Glucose-Konzentrationen und den theoretischen Glucose-Konzentrationen (je 0 bis 12 mM)

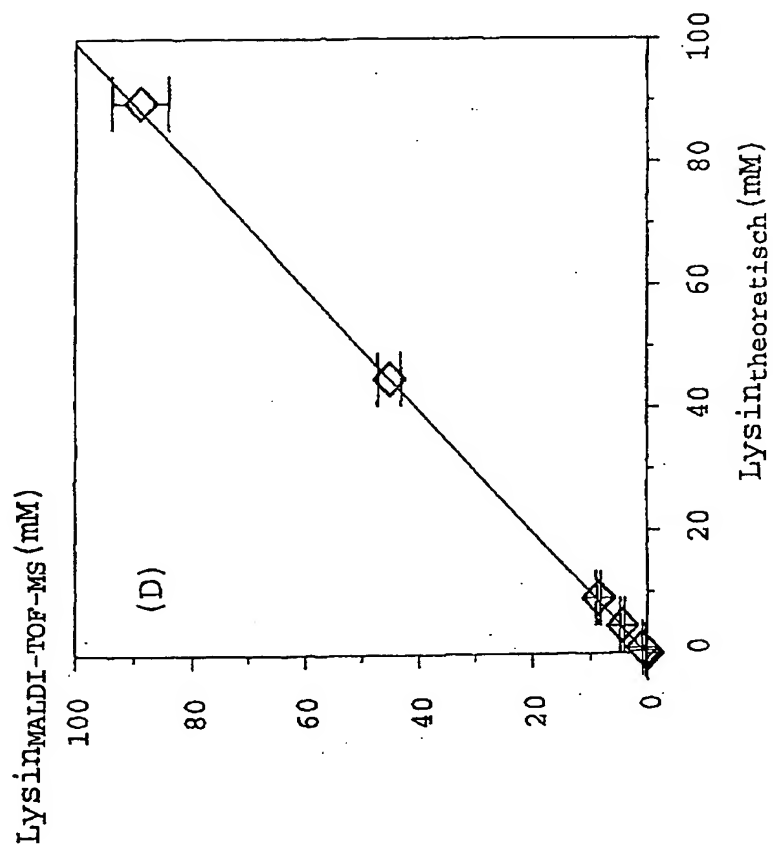


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

7/20

Figur 2d: Korrelation zwischen gemessenen Lysin-Konzentrationen und den theoretischen Lysin-Konzentrationen (je 0 bis 100 mM)

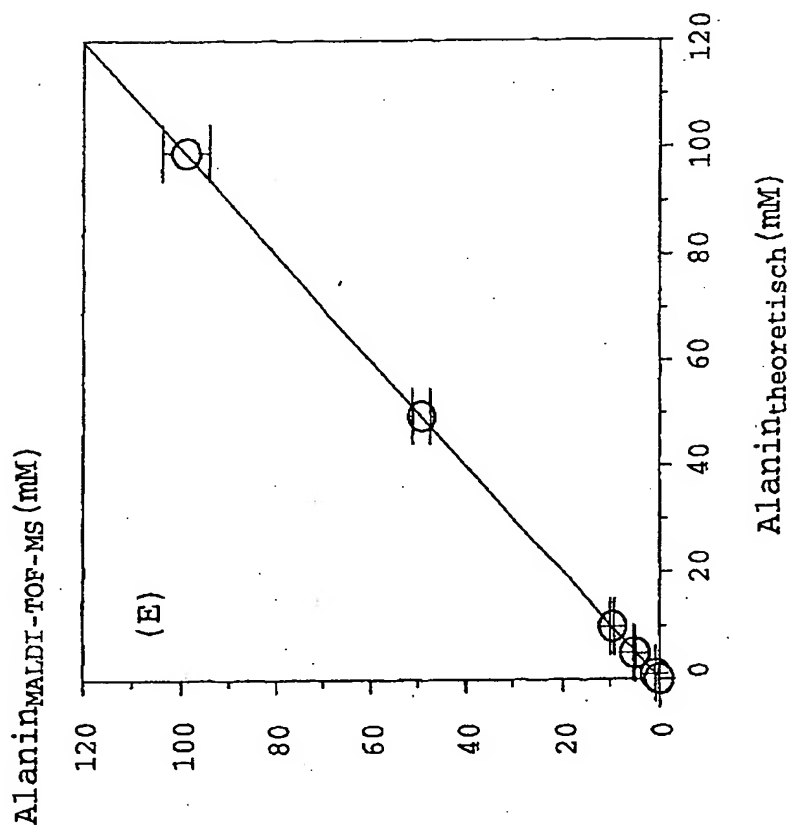


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

8/20

Figur 2e: Korrelation zwischen gemessenen Alanin-Konzentrationen und den theoretischen Alanin-Konzentrationen (je 0 bis 120 mM)

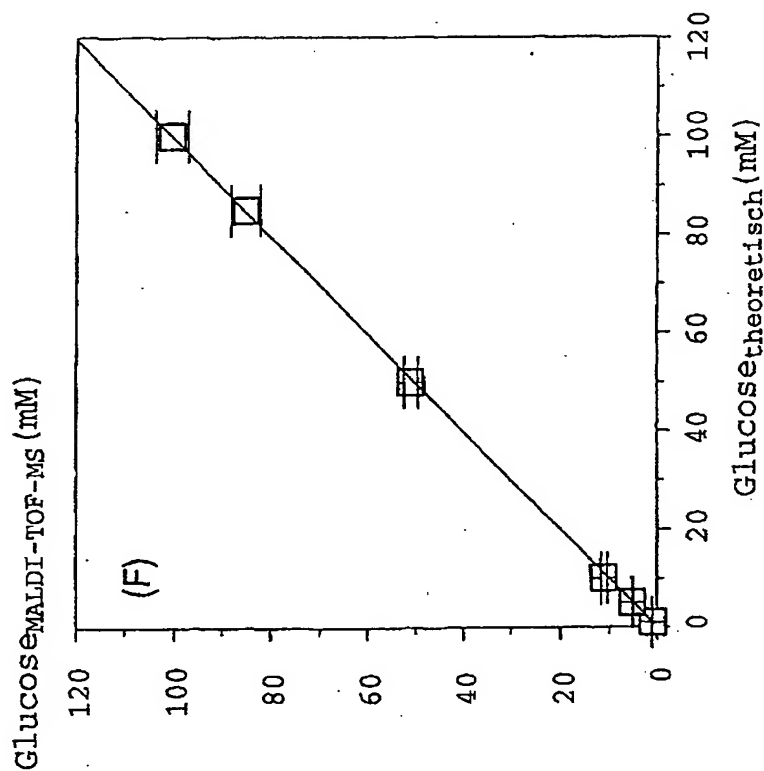


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

9/20

Figur 2f: Korrelation zwischen gemessenen Glucose-Konzentrationen und den theoretischen Glucose-Konzentrationen (je 0 bis 120 mM)



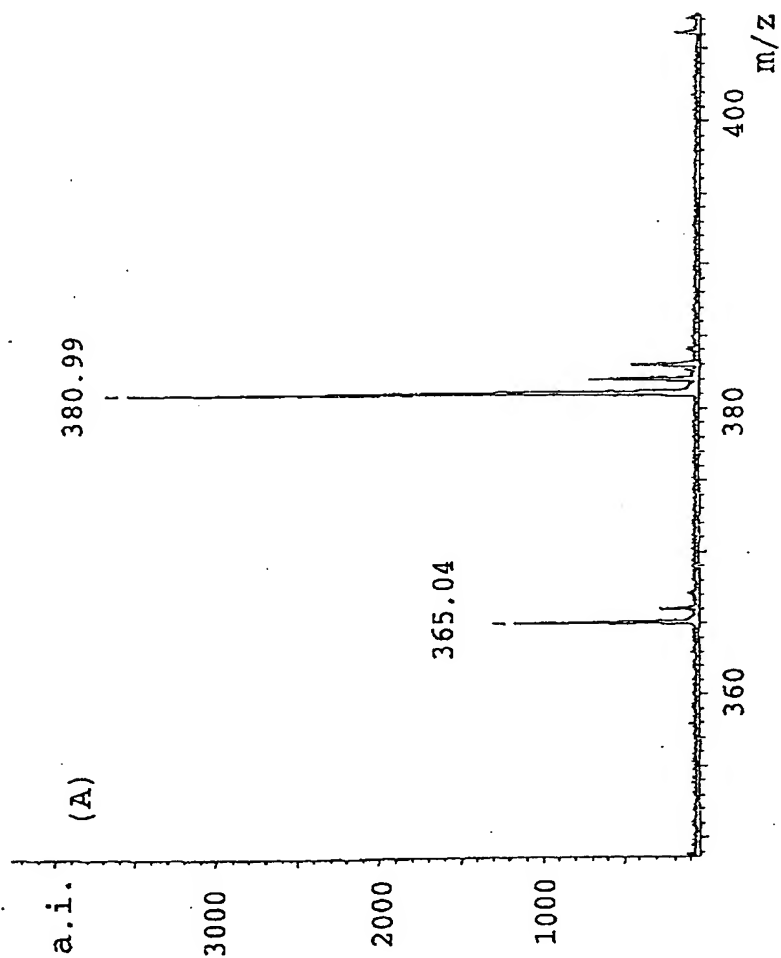


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

10/20

Figur 3a: C. glutamicum ATCC 21253 Anzucht in PMB Mineralmedium mit einer anfänglichen Konzentration von 20 g/l Melasse (Massenspektren von 1:5 verdünnten Kulturüberständen zu Beginn der Kultivierung)

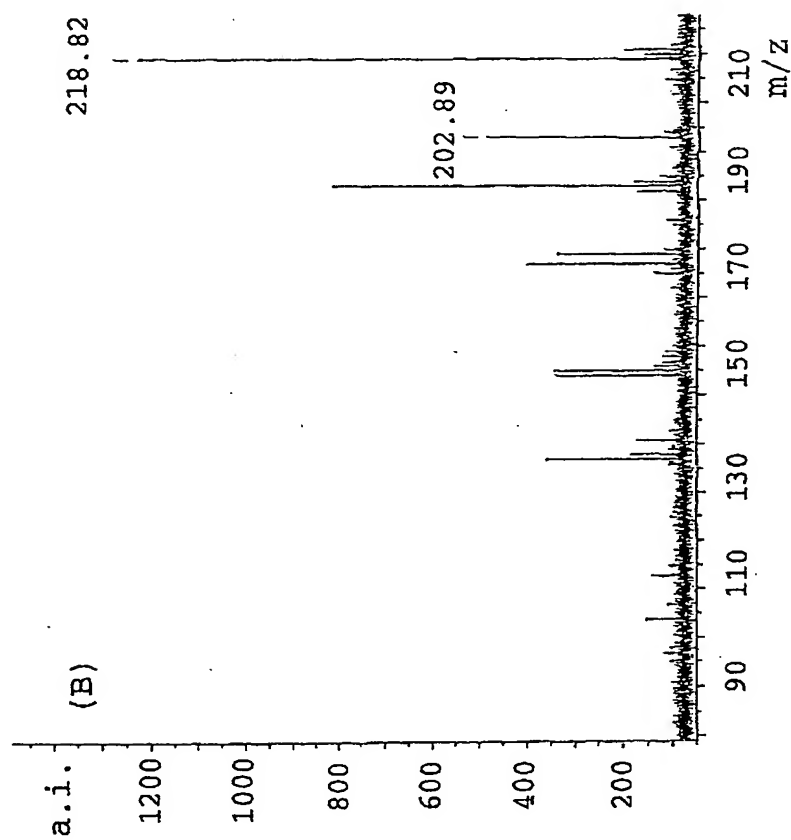


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

11/20

Figur 3b: *C. glutamicum* ATCC 21253 Anzucht in PMB Mineralmedium mit einer anfänglichen Konzentration von 18 g/l Glucose (Massenspektren von 1:5 verdünnten Kulturüberständen zu Beginn der Kultivierung)

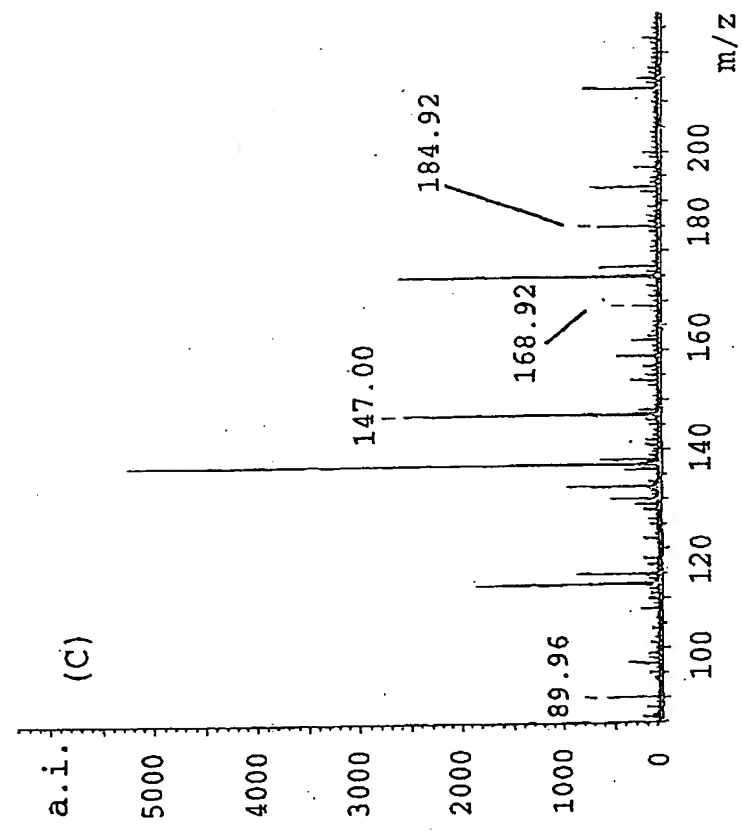


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

12/20

Figur 3c: C. glutamicum ATCC 21253, MALDI-Spektrum am Ende der Kultivierung nach 40 Stunden

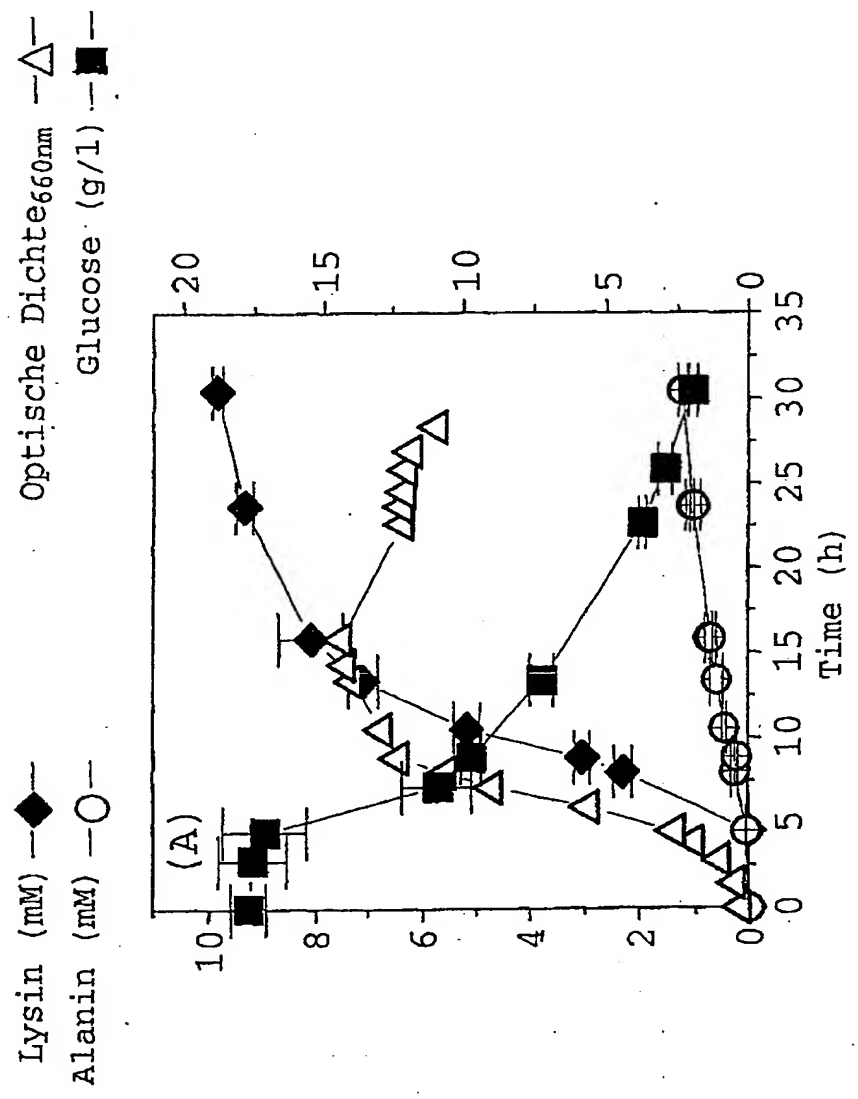


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

13/20

Figur 4a: Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC 21253 in PMB Medium mit Glucose

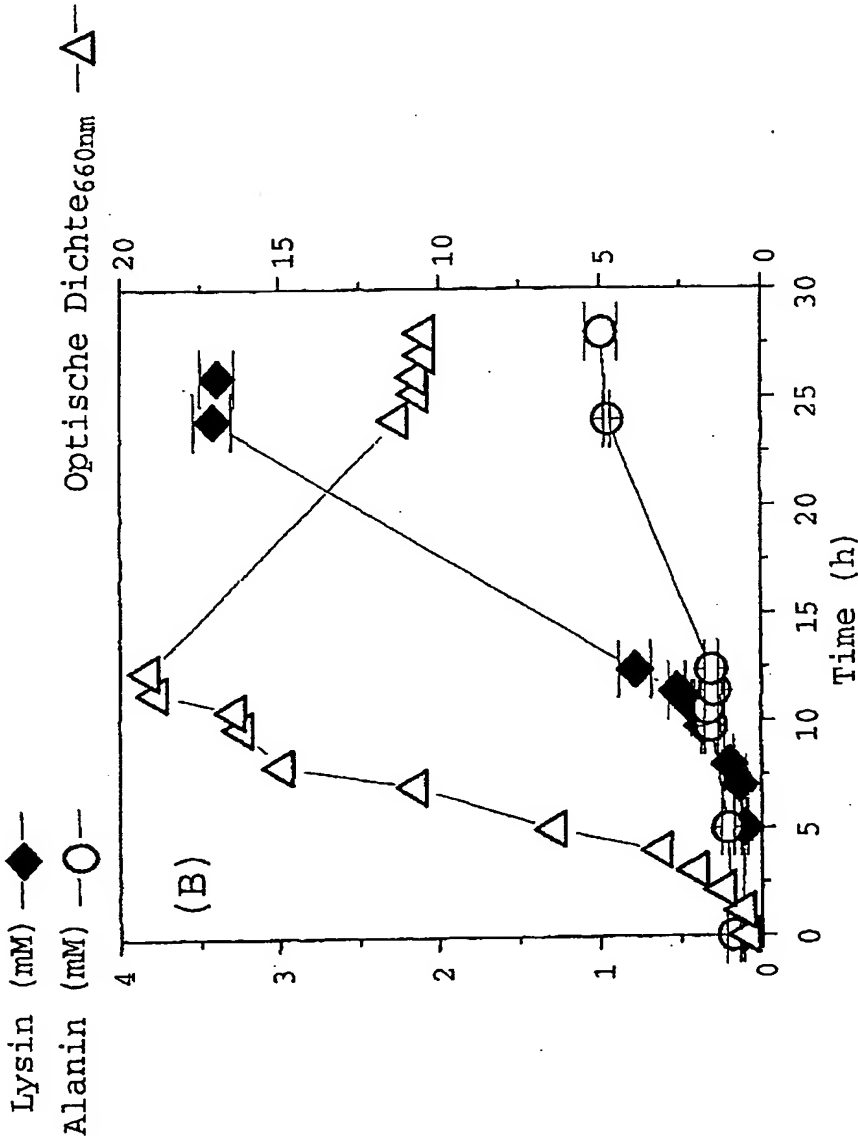


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

14/20

Figur 4b: Kultivierung von C. glutamicum ATCC21253 in PMB Medium mit Melasse

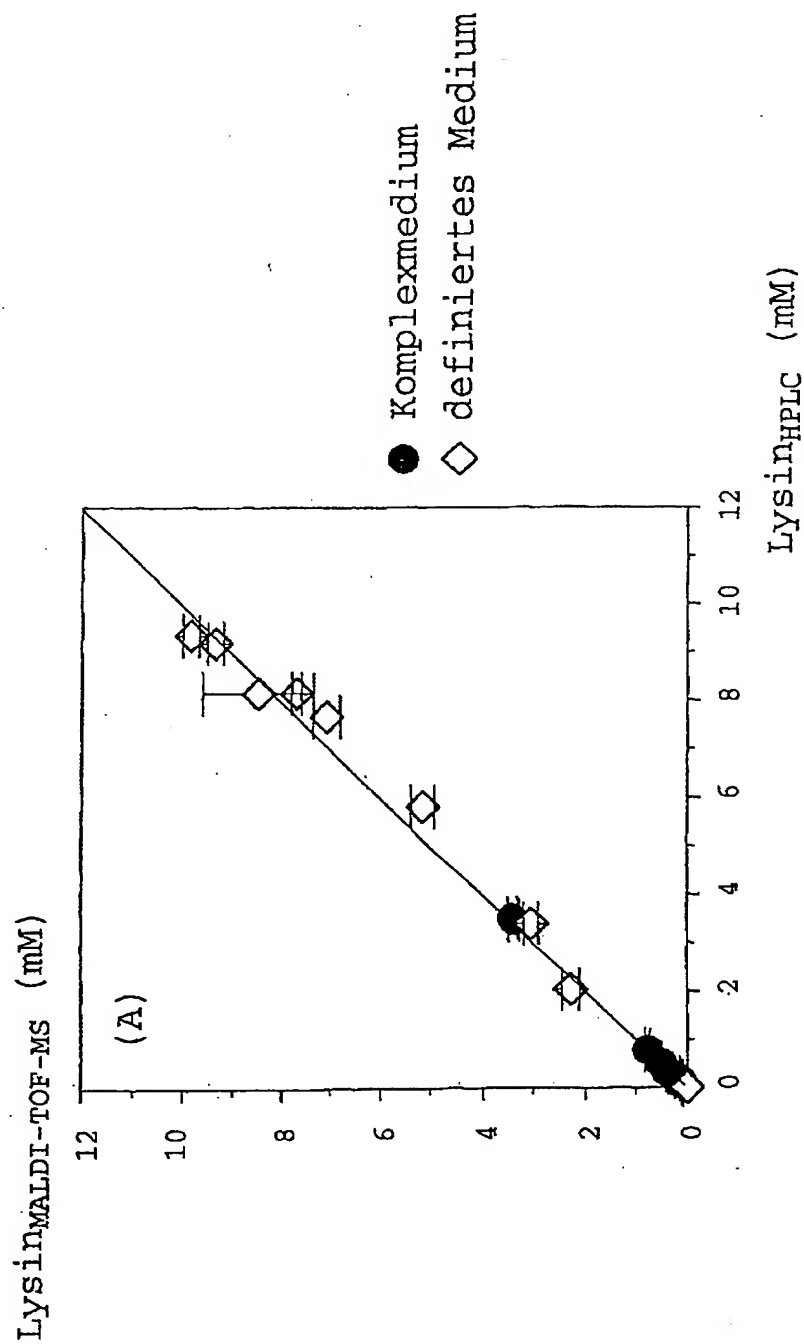


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

15/20

Figur 5a: Vergleich von MALDI-TOF-MS-Messung mit HPLC bei der Quantifizierung von Lysin (0 bis 12 mM)

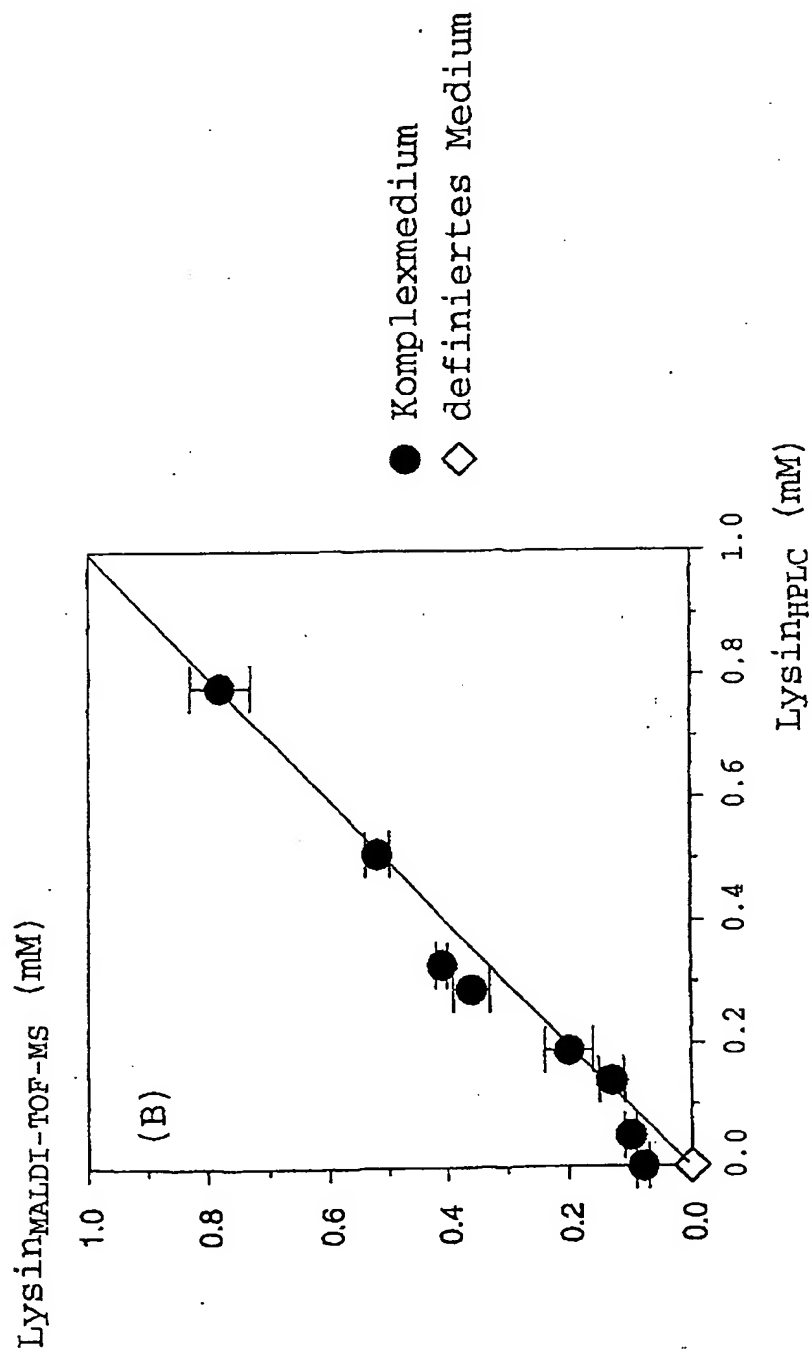


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

16/20

Figur 5b: Vergleich von MALDI-TOF-MS-Messung mit HPLC bei der Quantifizierung von Lysin (0 bis 1 mM)

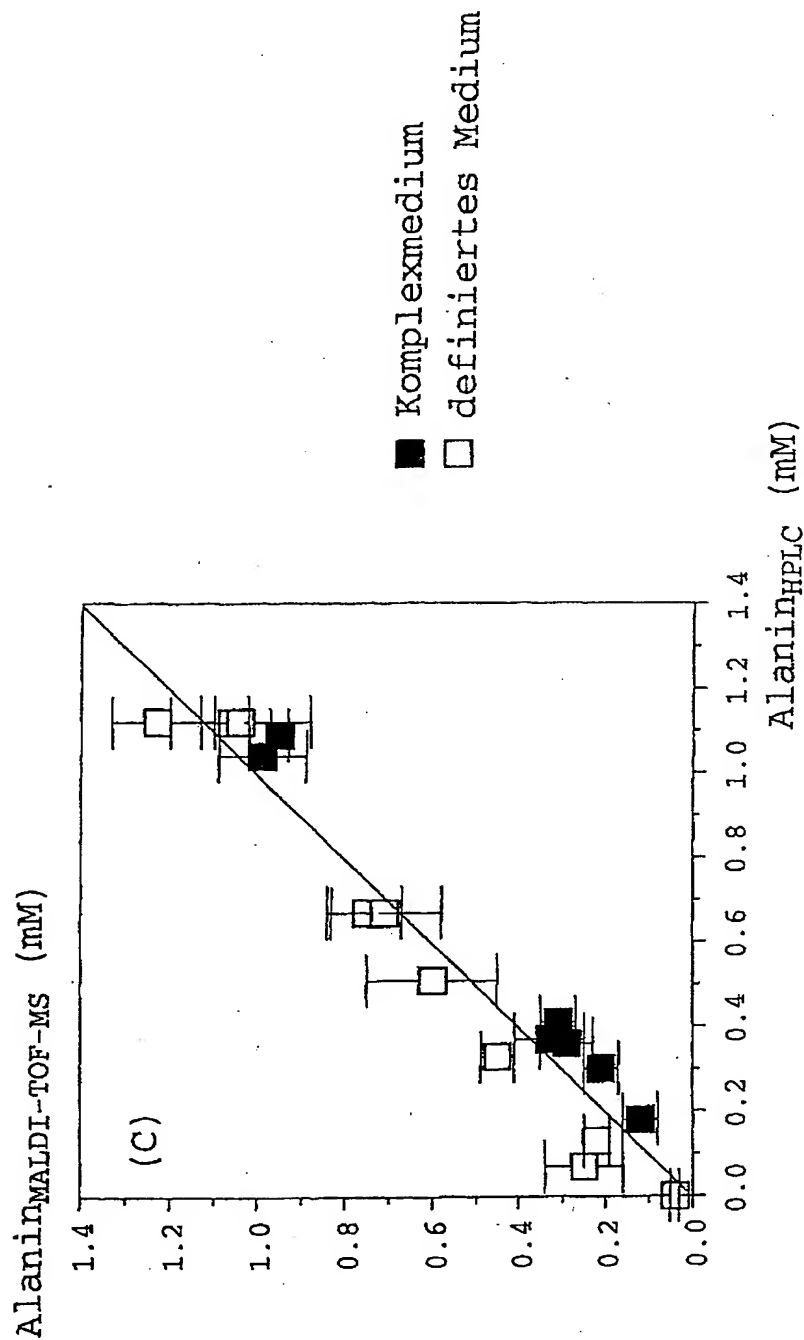


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

17/20

Figur 5c: Vergleich von MALDI-TOF-MS-Messung mit HPLC bei der Quantifizierung von Alanin (0 bis 1,4 mM)



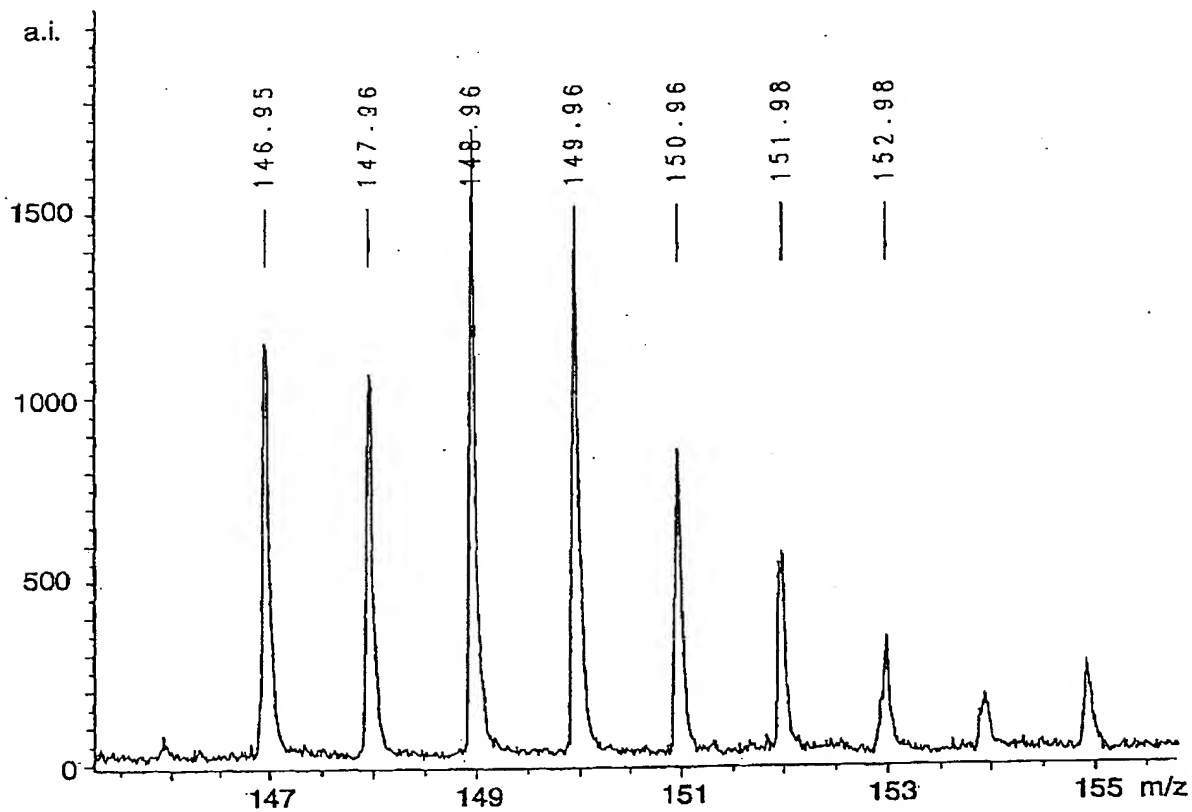


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

18/20

Figur 6

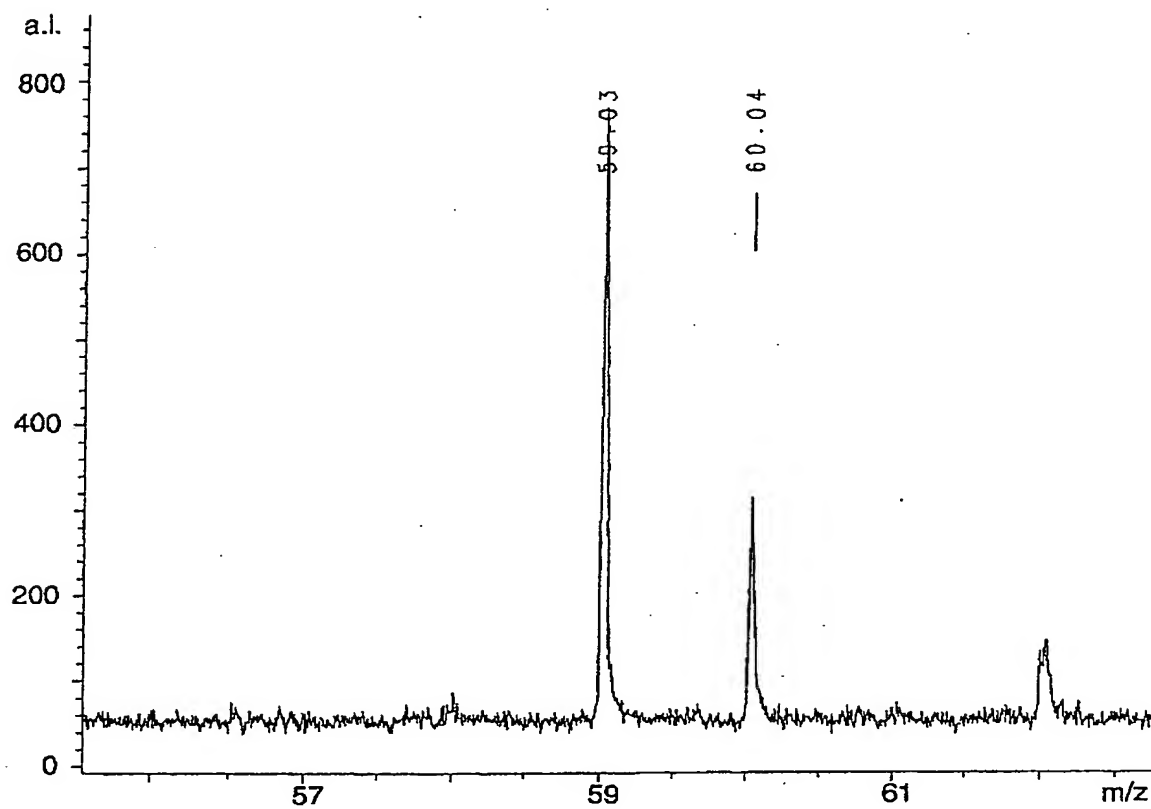


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

19/20

Figur 7

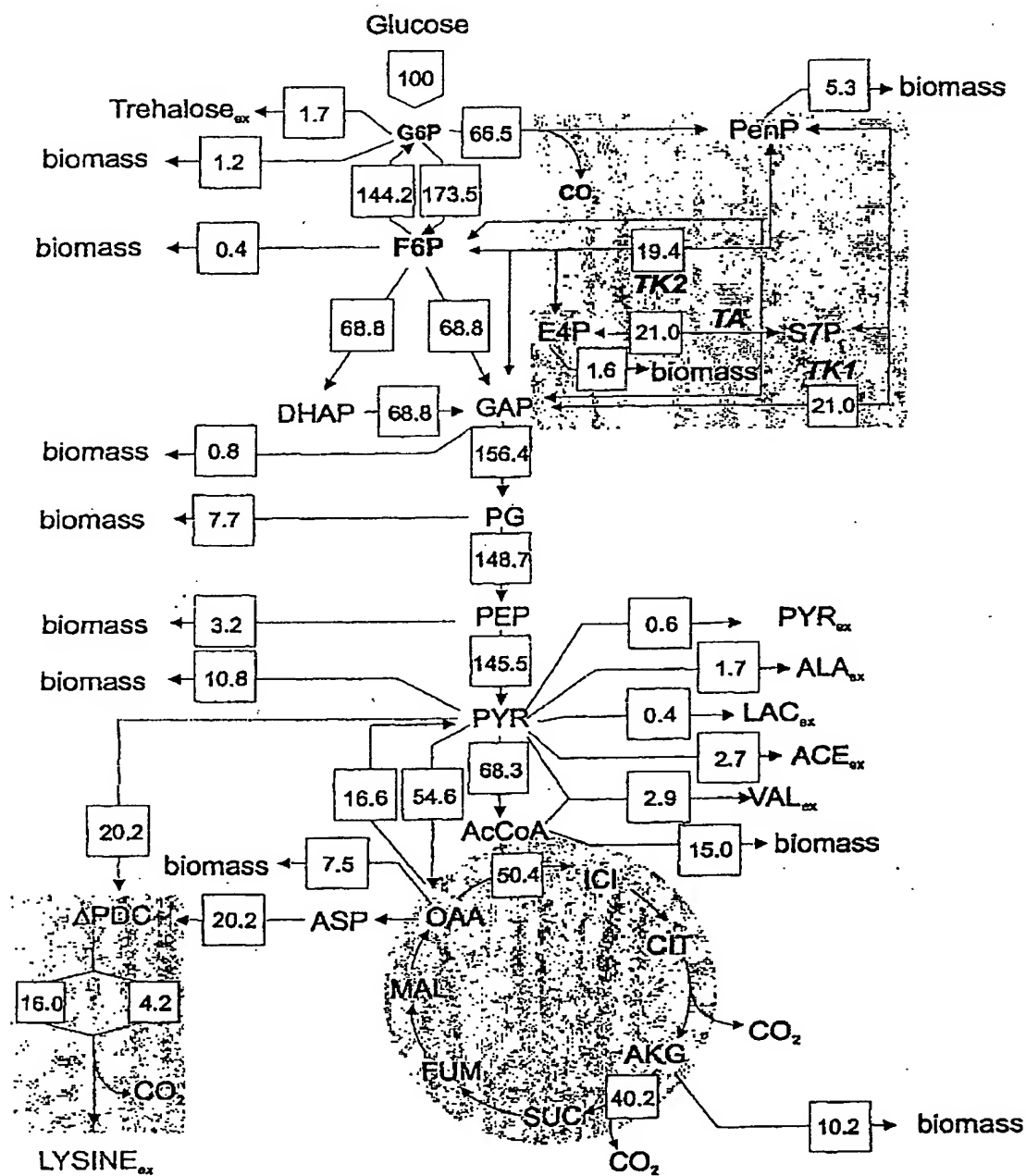


WO 01/94910

PCT/EP01/06415

20/20

Figur 8



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**